

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main Direktor: Professor Dr. med. E. Heinz

Über das Vorkommen von zweiwertigem
Kupfer im Nucleoprotamin der Herings-
spermatozoenkerne und über die inter-
molekulare Komplexbildung des Protamins

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
HANNS-PETER NAST
aus Berlin

Frankfurt/Main 1963

1964

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main Direktor: Professor Dr. med. E. Heinz

Über das Vorkommen von zweiwertigem
Kupfer im Nucleoprotamin der Herings-
spermatozoenkerne und über die inter-
molekulare Komplexbildung des Protamins

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
HANNS-PETER NAST
aus Berlin

Frankfurt/Main 1963



Dekan: Prof. Dr. Frey
Referent: Prof. Dr. Róka
Korreferent: Prof. Dr. Wacker

Mündliche Prüfung: 13. Februar 1964

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1 - 10
II. <u>Theoretische Betrachtungen</u>	10 - 16
a) Theorie der Komplexbildung	10 - 15
b) Nachweismöglichkeiten des Kupfers	15 - 16
III. <u>Darstellung und Diskussion der Ergebnisse</u>	17
a) Kupfernachweis nach der Methode von Eden und Green	17 - 23
b) Diskussion der Ergebnisse nach der Methode von Eden und Green	24 - 26
c) Fraktionierung des Clupeins	27
d) Untersuchung des Protamins in der Tiselius-Elektrophorese	28 - 31
e) Polarographischer Nachweis des Kupfers	31 - 32
f) Untersuchung der pH- und Temperatur- stabilität des Komplexes	33 - 34
g) Bestimmung der Aktivität des Komplexes gegenüber p-Nitrophenylazetat	34 - 36
IV. <u>Untersuchungen über die Rekombination von Nukleoprotamin unter dem Einfluß von Kupfer-Ionen</u>	36 - 37
V. <u>Zusammenstellung der Ergebnisse</u>	38 - 40
VI. <u>Experimenteller Teil</u>	41 - 80
VII. <u>Literatur</u>	

I. Einleitung

Die Protamine sind stark basische, niedermolekulare Eiweiße, die salzartig mit der Nukleinsäure zu den Nukleoprotaminen verbunden sind. Sie wurden 1868 von F. MIESCHER in den Spermien des Lachses entdeckt. 20 Jahre später gelang es A. KOSSEL (1) deren Eiweißnatur nachzuweisen. Er nahm an, daß die Protamine aus hochkomplizierten Körpereiweißen gebildet werden und daß aus ihnen nach der Befruchtung der Eizelle, entsprechend der Entwicklung zum neuen Organismus, alle Organeiweiße synthetisiert werden. Das CLUPEIN, das Protamin des Herings, wurde vor allem von FELIX und Mitarbeitern untersucht. Das CLUPEIN kann relativ leicht und in großer Menge aus Heringstestikeln gewonnen werden. Dazu werden die frisch gestreiften Spermatozoen in dest. Wasser suspendiert. Die Zellen plasmolysieren, das Cytoplasma löst sich ab, und die Kerne lassen sich leicht abzentrifugieren und als ein weißliches Trockenpulver herstellen (2). Nach den in der Literatur zu findenden Analysen enthalten diese Kerne 19,73 % Stickstoff, 5,76 % Phosphor und 30,42 % Arginin. Das so gewonnene Kernmaterial löst sich in 10 % NaCl-Lösung vollständig auf. Diese Arbeitsanweisung geht auf die Untersuchungen von MIRSKY und POLLISTER (4) zurück. Gießt man die visköse opaleszierende Lösung in dest. Wasser

ein, so fällt eine faserige weiße Masse aus, das Nukleoprotamin. Das Nukleoprotamin enthält 19,52 % Stickstoff und 5,65 % Phosphor (2). Das Verhältnis Stickstoff zu Phosphor verschiebt sich dabei von 3,42 nach 3,45 (5). Daraus kann man den Schluß ziehen, daß bei dieser Extraktion ein Eiweiß zurückgeblieben ist. Nach der Ansicht von FELIX handelt es sich dabei um Cytoplasma, das dem Kern in einem schmalen Saum noch anhaftete.

Diese Annahme wird durch den positiven Ausfall der Farbreaktionen auf Cystin, Tyrosin und Tryptophan gestützt, die nach den Analysen des Protamins (1, 6, 7, 8, 9, 10) nicht am Aufbau des Kerneiweißes beteiligt sind.

Das so gewonnene Nukleoprotamin kann durch verschiedene Methoden in seine Bausteine, die DNS und das Protamin, zerlegt werden. Das Protamin wurde nach der Methode von MOORE und STEIN (11) auf seine Aminosäurezusammensetzung untersucht und daraus das molekulare Verhältnis der Aminosäuren berechnet (12).

Tabelle I: Aminosäurezusammensetzung des Nukleoprotamins, Clupeins und der DNS/I in μ Mol/100 mg Trockengewicht.

Aminosäuren	Nukleoprotamin	Clupein	DNS/I
Asparaginsäure	3,95	-	3,84
Serin/Threonin	36,3	70,10	6,76
Glutaminsäure	4,12	-	5,18
Prolin	23,70	32,1	2,80
Glykokoll	-	8,26	-
Alanin	21,19	34,41	8,08
Valin	16,49	32,18	2,61
Isoleucin	6,18	8,99	1,67
Leucin	4,38	-	4,68
Arginin-HCl	175,10	417,00	-

Bei dem Vergleich des Aminosäuregehaltes des Nukleoprotamins mit dem des daraus gewonnenen Protamins wurde festgestellt, daß ein geringer Anteil der Aminosäuren am DNS-Molekül verbleibt und offensichtlich nicht zum Protamin gehört. Eine Gegenüberstellung des Phosphorgehaltes des Nukleoprotamins mit dem der DNS, sowie des Arginingehaltes des Nukleoprotamins mit dem des Clupeins ergibt ein Verhältnis der DNS zum Protamin im Nukleoprotamin von ungefähr 60 % : 40 % (5). Um aber die negativen Ladungen der DNS durch die positiven Ladungen

der Argininreste des Protamins exakt auszugleichen, wäre eine Zusammensetzung von 63 % DNS und 37 % Protamin notwendig (13). Diese Differenz zwischen den gefundenen und den zu erwartenden Werten erklärt ein leichtes Übergewicht der negativen Ladungsträger, das für die Wasserlöslichkeit verantwortlich ist. Nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (14, 15) liegt die Desoxyribonukleinsäure in einer Helix-Konfiguration vor, für die WATSON und CRICK (16) einen speziellen Typ der Paarung der enthaltenen Stickstoffbasen fordern. Die Informationen über die Struktur des Nukleoprotamins (16) lassen den Schluß zu, dass das Protein nicht fest an die DNS gebunden ist. Nach den Ergebnissen der Röntgenstrahlenbrechung und den Untersuchungen an synthetischen Nukleoproteinmodellen muß angenommen werden, daß sich das Proteinmolekül als dritter Strang um die doppelsträngige DNS der Helix-Konfiguration windet.

Die Desoxyribonukleinsäure wird normalerweise als Natriumsalz gewonnen. Wenn das Protein sich mit der Nukleinsäure verbindet, kann das Ausmaß der Bindung durch die Anzahl der freigesetzten Natriumionen bestimmt werden. Nach den flammenphotometrischen Untersuchungen enthält die DNS ein Natriumion pro Phosphatgruppe. Demgegenüber enthalten intakte Spermienköpfe oder das daraus extrahierte Nukleoprotamin nur 1/10 oder weniger des pro Phosphatgruppe berechneten Natrium-

oder Kaliumgehaltes, der größere Anteil wurde durch die Bindung des Proteins oder des Protamins verdrängt. Bei dem Protaminmolekül handelt es sich um eine Polypeptidkette mit über $2/3$ Argininresten (17), mit einer Reihenfolge von 4 Argininen gefolgt von 2 neutralen Aminosäuren. Die einzige Möglichkeit, in der sich das Protaminmolekül mit der DNS verbinden kann, besteht in einem Ausgleich der elektrostatischen Ladungen der positiven Amidgruppen des Arginins mit den negativen Ladungen des Phosphates der Nukleotidbasen durch van der Waalssche Kräfte.

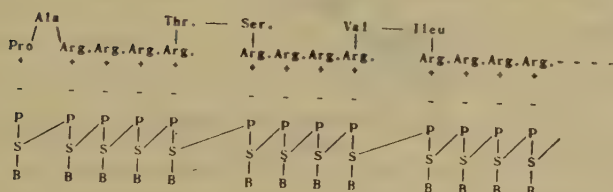


Abb. Nr. 1 : Ein sehr vereinfachtes Schema eines Nukleoprotamins, P bedeutet Phosphorsäure, S für Deoxypentose und B für Purin oder Pyrimidin.

Die neutralen Aminosäuren ragen als Schlaufen aus dem Molekül heraus. Die Schlaufenbildung kann aber nur durch 2 nicht basische Aminosäuren gebildet werden, was auch durch die Sequenzanalysen des Protamins bestätigt wurde (17, 18).

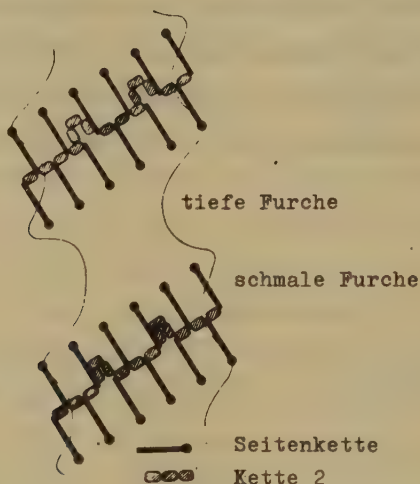


Abb. Nr.2 :

Diese theoretischen Überlegungen führen aber nur dann zu richtigen Ergebnissen, wenn es einwandfrei feststeht, daß nur Protamin als Kerneiweiß in Frage kommt. Demgegenüber stehen die Einwände von STEDMANS (19) und von MIRSKY und RIS (20). Aus Bilanzuntersuchungen ordern sie die Existenz einer weiteren Kernsubstanz. Stedmans nennen sie CHROMOSOMIN und Mirsky und Ris ESIDUALCHROMOSOM. Felix und Mitarbeiter (2) extrahieren ihre Kernpräparate mit verdünnter Schwefelsäure.

Im säureunlöslichen Rückstand fanden sie nach der Hydrolyse noch reichlich Arginin neben den üblichen Aminosäuren des Clupeins. Weiterhin ließ sich im Hydrolysat noch Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin, Tryptophan und Cystin nachweisen. In Anlehnung an die Ergebnisse von STEUDEL (21) vermuteten die genannten Autoren, daß das Protamin sich nicht vollständig extrahieren läßt. Das Auftreten der nicht im Clupein vorhandenen Aminosäuren erklärten sie damit, daß der säureunlösliche Rest ein Gemisch aus Protamin, DNS und Cytoplasma sei. Bei den Untersuchungen von TABRIZI (12) über die quantitative Aminosäurezusammensetzung an Kernen von Heringspermatozoen und daraus gewonnenem Nukleoprotamin konnte er nachweisen, daß die Aminosäurezusammensetzung des Nukleoprotamins sich von der des Clupeins unterscheidet. Es ließ sich zeigen, daß die Kernpräparate nur Asparaginsäure und Glutaminsäure als zusätzliche Aminosäuren enthalten. Weiterhin ließ sich nachweisen, daß die Relationen der Aminosäuren zueinander im Nukleoprotaminmolekül eine andere als im Clupein ist. Durch die Einwirkung von Harnstoff konnte das Clupein relativ einfach abgetrennt werden. Die verbleibende DNS enthielt noch einen gewissen Teil Aminosäuren, der wahrscheinlich nicht zum Protaminmolekül gehört und durch andere Bindungsverhältnisse an der DNS verbleibt. Bezieht man sich auf die mit dieser Methode erhaltenen Mengen pro getrennter Aminosäure,

so errechnet sich ein Gewichtsanteil von 38,7 mg Aminosäuren / 100 mg Einwaage NP. Der Anteil der an der DNS verbleibenden Aminosäuren beträgt 7,2 mg. Unter Berücksichtigung dieser Restaminosäuren entfällt ein Gewichtsanteil von 38,33 mg bezogen auf 100 mg Nukleoprotamin auf das Clupein. Bei einem Verhältnis von DNS zu Protamin gleich 38,33 % zu 61,67 % verbleibt ein Anteil negativer Ladungsträger, die für die Löslichkeit des Nukleoprotamins verantwortlich sind. Bei einem nachweislichen Molgewicht der DNS von 10^6 und des Clupeins von 5 000 können sich 112 Clupeinmoleküle an die DNS binden. Dabei ist das Verhältnis DNS : Clupein gleich 64 % zu 36 %. Clupein enthält pro Mol 60 % Arginin, das sind ungefähr 19 Argininmoleküle / Mol Clupein oder 19 positive Ladungsträger. Für die Nukleoprotaminbildung aus einem Mol DNS und 112 Mol Clupein stehen $(19 \cdot 112 =)$ 2 118 positive Ladungen der Amidierungsgruppe des Arginins 2 873 negativen Ladungen der Phosphatreste der DNS bei einem Phosphatgehalt von 8,9 % gegenüber. Die Ladungsdifferenz muß durch kleinere Moleküle oder Ionen ausgeglichen werden. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei wahrscheinlich um Alkali- oder Erdalkalionen handelt.

Bei unseren Untersuchungen am Clupein ergab sich, daß sich das Carboxylende des Moleküls nicht mit N-Bromsuccinimid abspalten läßt.

Tabelle: Ergebnisse der Decarboxylierung von
Nukleoprotamin und Clupeinpräparaten

Substanz	$\mu\text{L CO}_2/10\text{mg}$ Substanz	errechnetes Molgewicht
Nukleoprotamin	-	-
Clupein (freie Base)	-	-
Clupein (freie Base) entkuppert	51,97	4310
Clupein-HCL I	54,61	5410
Clupein-HCL II	-	-
Clupein-HCL III	-	-

Da sich kein Anhalt dafür bot, dass die Carboxylgruppen verestert sind oder als Säureamidgruppierung vorliegen, wird vermutet, dass Schwermetallionen in Form von Chelatbindungen die Carboxylgruppen blockieren. Ein Anhalt hierfür lässt sich nur in der Arbeit von ZIMMERMANN finden, dass sich im Protamin ein gewisser Anteil von Kupfer befindet (45). Die vorliegende Arbeit sollte diesen Problemenkreis näher erfassen.

Folgende Fragen waren zu beantworten:

1. Ist das Kupfer als biologischer Bestandteil des Heringspermatozoenkernes anzusehen oder handelt es sich um eine Auswirkung der Präparationsmethoden ?
2. Welche Funktionen hat das Kupfer in der Bindung des Protamins an das DNS-Molekül zu erfüllen ?

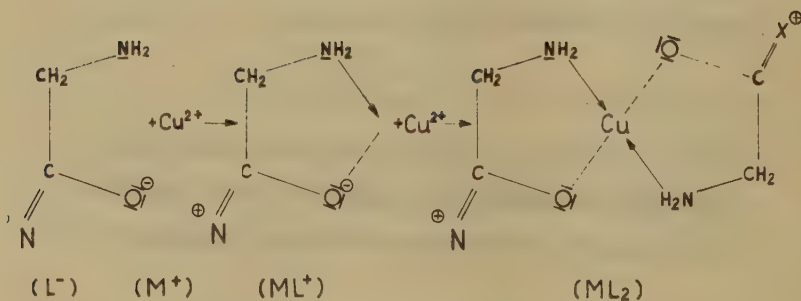
3. Da das Kupfer zuerst als Bestandteil des Protamins aufgefunden wurde, muss festgestellt werden, ob es zur intermolekularen Verknüpfung der Protaminmoleküle dient.

II. Theoretische Betrachtungen

a) Theorie der Komplexbildung

Das Problem der Metall-Peptid-Komplexe ist seit der Zeit aktuell, da man feststellte, dass einige proteolytische Fermente durch Metallionen aktiviert werden. Die Funktion des Metalls sieht man darin, dass es die Bindung zwischen Substrat und Enzym vermittelt.

Nach BJERRUM (46) erfolgt die Komplexbildung zwischen Metall und Peptid stufenweise: Aus einem 1 : 1 Komplex wird durch Zutritt eines zweiten Peptidmoleküls ein 2 : 1-Chelatkomplex gebildet.



Aus den Titrationskurven von 1 : 1-Komplexen, z.B. des Glycylglycins, lässt sich ersehen, dass es dabei zu einer Ionisation des Peptidwasserstoffs kommt. Die Reaktionsgleichung von äquimolaren Mengen Kupferionen und Glycylglycin muss daher folgendermassen formuliert werden:

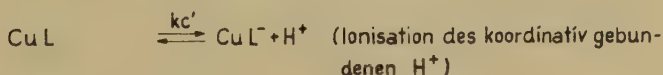
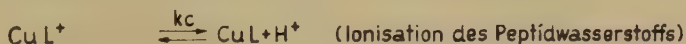


Abb. Nr. 4

Dieser Reaktionsablauf wird durch die neueren Ansichten über die Struktur der Peptidbindung abgeleitet. Die Peptidbindung als Resonanzhybride kann in drei tautomeren Formen vorliegen:

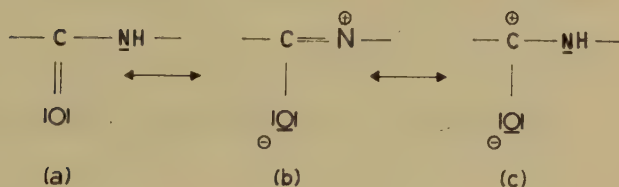
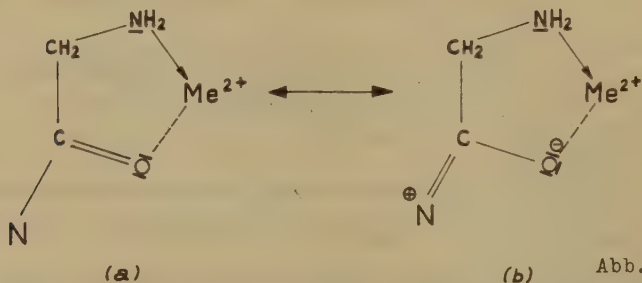


Abb. Nr. 5 :

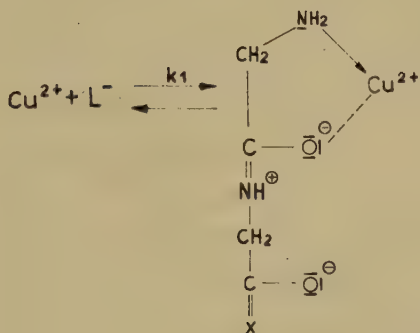
Betrachtet man die theoretische Resonanzhybride (c), so lässt sich erkennen, dass sie nicht den tatsächlichen Zustand des Moleküls beschreibt, sie kann also ausgeschlossen werden. Es verbleiben als noch mögliche hybride Formen die Zustände (a) und (b). Würde in der Zustandsform (a) der Peptid-Stickstoff koordinativ gebunden, liesse sich die Bindung (b) nicht mehr verwirklichen. So bleibt also der Schluss, dass nur die koordinative Bindung des Sauerstoffs ohne Behinderung der inneren Resonanz möglich ist. Der Komplex wäre also in der folgenden Weise zu formulieren:



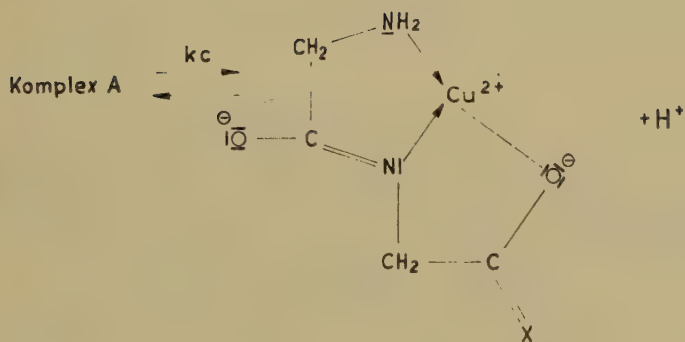
Nach der Komplexbildung kommt es zu einer Elektronenverschiebung und Ionisation des Peptid-N.

Demgegenüber stehen die Beobachtungen, dass der Kupferkomplex zu einer Ionisation des Peptidwasserstoffs vor der Komplexbildung neigt. Dabei muss noch hervorgehoben werden, dass es nur der Kupferkomplex ist und dessen Funktion nicht durch andere Metalle ersetzt werden kann.

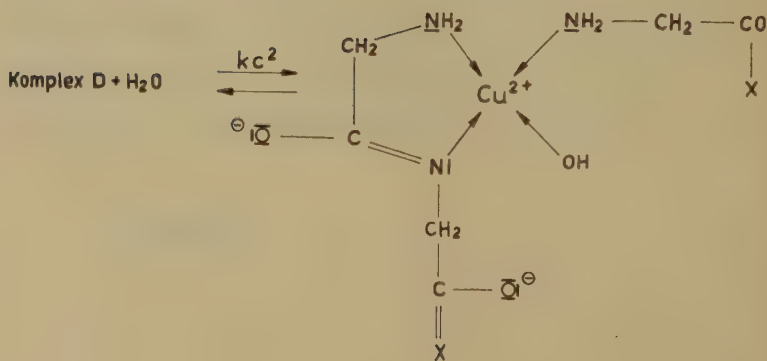
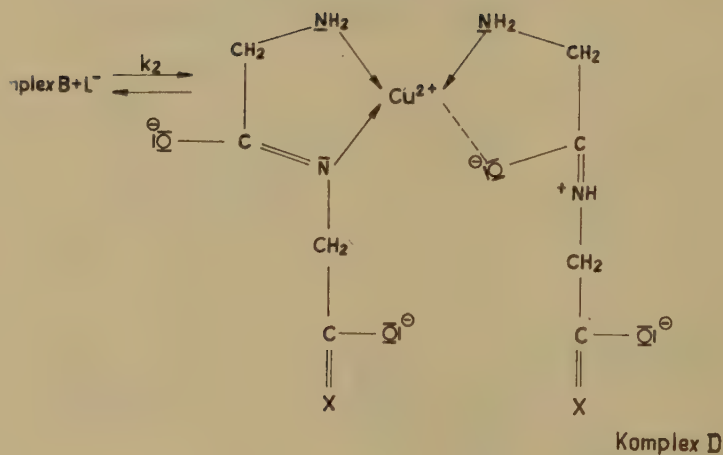
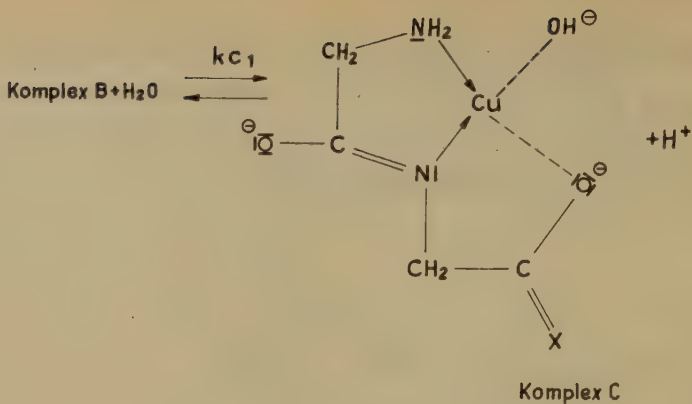
Kupferkomplexe verlangen daher das Aufheben der Einschränkung, dass der Stickstoff nicht nur zur koordinativen Bindung herangezogen werden kann. Ihre Komplexe müssen dann wie folgt formuliert werden:



Komplex A



Komplex B



Bei unseren Untersuchungen des Clupeins mit N-Bromsuccinimid stiessen wir auf die Tatsache, dass schonend dargestellte Präparate kein CO_2 abspalten. Wir vermuteten zuerst, dass die Carboxylgruppen durch Säureamidbildung blockiert sind. Da sich kein Ammoniak abspalten liess, untersuchten wir unsere Präparate auf ihren Metallgehalt und stellten fest, dass sowohl die Kernpräparate als auch das daraus gewonnene Nukleoprotamin und Clupein Kupfer enthielten. Andere Metalle liessen sich selbst in kleinen Mengen nicht nachweisen. Natürlich erhob sich sofort die Frage, ob es sich bei der Anwesenheit des Kupfers um ein Artefact handelt, oder ob dem Kupfer eine biologische Funktion zukommt. Wir begannen damit unsere Präparationsschritte so einzurichten, dass die Anwesenheit von Kupfer in den Reagenzien und Lösungsmitteln ausgeschlossen wird. So wurde alles bidestillierte Wasser über eine Austauschersäule gezogen und die Reagenzien aus kupferfreien Lösungsmitteln umkristallisiert. War dieser Schritt nicht möglich, wurden bei der Präparation Komplexbildner zugesetzt.

b) Nachweismöglichkeiten des Kupfers.

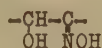
Die Voraussetzung für die Reaktionsfähigkeit organischer Verbindungen mit Metallionen ist stets die Anwesenheit von bestimmten Atomgruppen, die von FEIGL als affine Gruppen bezeichnet wurden. Bei diesen Gruppen kann es sich handeln:

1. Um saure Atomgruppen, deren H-Atome durch Metalle ersetzbar sind (normale Salzbildung).
2. Um Atome oder Atomgruppen, die sich durch koordinative Bindung an das Metallion anlagern (Komplexbildung).
3. Um die gleichzeitige Bestätigung einer salzartigen und einer koordinativen Bindung, die meist von verschiedenen Stellen des Moleküls ausgehen (innere Komplexsalze).

Die Reaktionsweise der organischen Reagenzien besteht nur bei einer geringen Anzahl in normaler Salzbildung, die meisten der durch die organischen Fällungsmittel erzeugten Niederschläge sind Komplexverbindungen, und zwar vorwiegend Innerkomplexverbindungen. In der angelsächsischen Literatur werden sie als Chelat-Verbindungen bezeichnet.

Als Beispiel für die spezifische Wirkung bestimmter Atomgruppen seien die folgenden genannt:

- a) α -Benzoinoxim, das die für Kupfer spezifische Gruppe

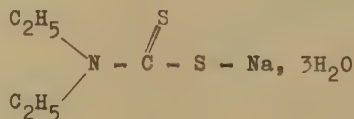


enthält.

- b) Salicylaldoxim



- c) Natriumdiäthylthiocarbamat



III. Darstellung und Diskussion der Ergebnisse

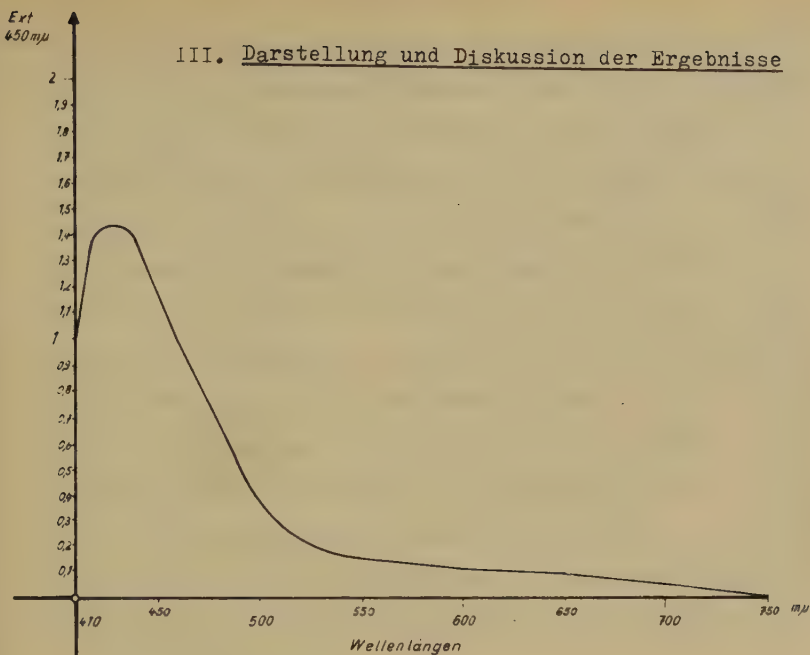


Abb. Nr. 9: Absorptionsmaximum des Cu-Diäthylthiocarbamatkomplexes.

a) Kupfernachweis nach der Methode von EDEN und GREEN

Für unsere Zwecke schien die Methode von EDEN und GREEN am besten geeignet zu sein. Zum Nachweis des Kupfers muss die Lösung oder das Veraschungsgemisch bei fast neutralem pH mit Na-diäthylthiocarbamat versetzt werden. Der sich bildende Komplex wird mit Amylalkohol ausgeschüttelt und photometrisch gemessen. Um die Fehlermöglichkeiten und die Nachweisgrenzen der Methode zu erfassen, haben wir das Absorptionsmaximum des Komplexes bestimmt und dessen Ausbleichungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH bestimmt. In Übereinstimmung mit der Literatur fanden wir das Maximum der Absorption bei 430 mμ (Abb. 9).

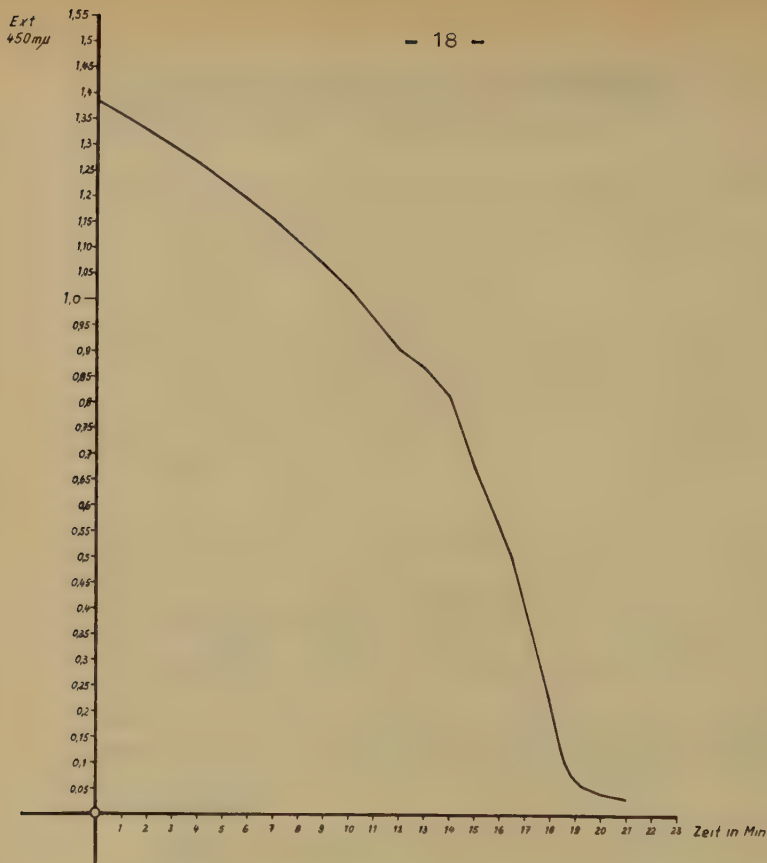


Abb. Nr. 10 : Ausbleichung des Cu-Diäthylthiocarbamatkomplexes bei unverändertem pH ($t/2 = 15$ Min.)

Allerdings wichen unsere Ergebnisse bei gleichbleibenden Kupfermengen stark voneinander ab. Besonders störend machte sich eine schnell zunehmende Trübung im Amylalkohol bemerkbar. Der Fehler konnte durch verschiedene Bedingungen hervorgerufen werden. Aus den angeführten Gründen be-

stimmten wir zuerst die Ausbleichungsgeschwindigkeit des Kupfer-Diäthylldithiocarbamatkomplexes. Wurde die Bestimmung entsprechend den Angaben von EDEN und GREEN durchgeführt, fanden wir eine Ausbleichungsgeschwindigkeit von $t/2 = 15$ Minuten. (Abb.Nr. 10). Diese Zeit schien uns für unsere Routineuntersuchungen ungeeignet. Bei der pH-Kontrolle stellten wir fest, dass unsere Ansätze, die bis zur Ausschüttelung des Komplexes vorbereitet waren, starke Schwankungen in den pH-Werten zeigten. Wir entschlossen uns, die Methode so abzuändern, dass die Extraktion bei konstantem pH durchgeführt werden konnte. Wir führten daher die Cu-Bestimmung bei pH 6,8 , 7,0 und 7,2 durch. Das Milieu wurde dabei durch einen Phosphatpuffer auf den gewünschten Wasserstoffionendruck eingestellt. (Abb. Nr. 11)

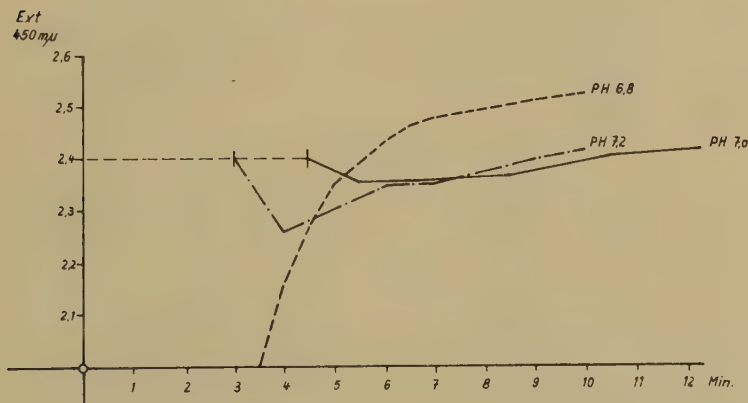


Abb. Nr. 11: Darstellung des Bildungsverlaufes des Cu-Diäthylldithiocarbamatkomplexes bei verschiedenem pH.

Aus dem Verlauf der Kurven ist ersichtlich, daß die Komplexbildung bei pH 7,0 und 7,2 sofort stattfindet. Nach drei bis vier Minuten setzten die ersten Trübungseffekte ein. Aus diesem Grunde wurden die Ansätze durch kupferfreie Filter filtriert und die Komplexbildung weiter beobachtet. Nach ungefähr 10 Minuten hat sich die ursprüngliche Extinktion wieder eingestellt. Anders ist das Verhalten des Komplexes bei pH 6,8. Hier entwickelt sich der Komplex relativ langsam und steigt bei zunehmender Eintrübung über die zu erwartenden Absorptionswerte. Die Ausbleichungsgeschwindigkeit des Komplexes war zudem bei pH 7,0 am niedrigsten und die Absorptionswerte blieben über Stunden konstant. Es war daher angeraten, alle Cu-Bestimmungen bei diesem pH durchzuführen.

Fehlerrechnung der Kupferbestimmung nach EDEN und GREEN

I) Messreihe: 0,1 - 1,0 g

0,1056
0,1350
0,2385
0,2112
0,2592
0,3.88
0,0583
0,3842
0,4282
0,5075

II) Messreihe: 1,0 - 10,0 g

0,6134
1,0882
1,6409
2,0820
2,4799
2,8930
3,2926
3,4975
3,6950
3,8460

$$\sum x_i 5,3 \quad \sum y_i 2,9365$$

$$\sum x_i 53 \quad \sum y_i 25,1285$$

$$\sum x_i^2 3,85 \quad \sum y_i^2 1,03062$$

$$\sum x_i^2 385 \quad \sum y_i^2 74,6255$$

Berechnung der Abweichungen:

für 0,1 - 1,0 g Cu⁺⁺

für 1,0 - 10,0 g Cu⁺⁺

$$\begin{aligned} \sum y^2 & 1,03062 \\ n \sum y^2 & 10,3062 \\ - (\sum y)^2 & 8,6440 \\ \hline n S_{yy} & 1,6622 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum y^2 & 74,6255 \\ n \sum y^2 & 746,255 \\ (\sum y)^2 & 631,442 \\ \hline n S_{yy} & 114,813 \end{aligned}$$

$$s^2 = \frac{n S_{yy}}{n(n-1)} = \frac{1,6622}{90} = 0,01847$$

$$s^2 = \frac{n S_{yy}}{n(n-1)} = \frac{144,813}{90} = 1,2757$$

$$S^2 = \frac{s^2}{n-2} = \frac{0,01847}{8} = 0,00231$$

$$S^2 = \frac{s^2}{n-2} = \frac{1,2757}{8} = 0,1594$$

Mittlere quadratische Abweichungen:

$$s = \sqrt{0,01847} = 0,139$$

$$s = \sqrt{1,2757} = 1,162$$

Standardabweichung:

$$S = \sqrt{0,00231} = 0,0494$$

$$S = \sqrt{0,1594} = 0,39$$

$$t = \frac{\bar{y}}{S} = 0,29365 = 0,0$$

$$t = \frac{\bar{y}}{S} = 2,51285 = 0,0$$

Regressionsgerade

I) für 0,1 - 1,0 g Cu⁺⁺

Σxy	1,96022	Σx_i^2	3,85
$n \Sigma xy$	19,6022	$n \Sigma x_i^2$	38,50
$-\Sigma x \Sigma y$	15,5640	$-(\Sigma x_i)^2$	28,05
$n S_{xy}$	4,0382	$n S_{xx}$	10,41

$$b_{xy} = \frac{n S_{xy}}{n S_{xx}} = \frac{4,0382}{10,41} = 0,3875$$

II) für 1,0 - 10 g Cu⁺⁺

Σxy	168,5412	Σx_i^2	385
$n \Sigma xy$	1685,4120	$n \Sigma x_i^2$	3850,00
$-\Sigma x \Sigma y$	1331,8105	$-(\Sigma x_i)^2$	280,90
$n S_{xy}$	353,6015	$n S_{xx}$	3569,10

$$b_{xy} = \frac{n S_{xy}}{n S_{xx}} = \frac{353,6015}{3569,1} = 0,09907$$

Konstruktion der Geraden

I) $0,1 - 1,0 \text{ g Cu}^{++}$

$$\bar{y} = m\bar{x} + n \quad \bar{y} = 0,294$$

$$\bar{x} = 0,53$$

$$0,294 = 0,3879 \cdot 0,53 + n \quad m = 0,3879$$

$$0,294 - 0,2055 = n$$

$$n = 0,0884 \quad \text{Abschnitt auf d. y-Achse}$$

II) $1,0 - 10,0 \text{ g Cu}^{++}$

$$\bar{y} = m\bar{x} + n \quad \bar{y} = 2,513$$

$$\bar{x} = 5,3$$

$$m_1 = 0,09907$$

$$2,513 = 0,09907 \cdot 5,3 + n$$

$$2,513 - 0,525 = n$$

$$n = 1,988 \quad \text{Abschnitt auf d. y-Achse}$$

Eichkurve 0,1—1,0 μ Cu⁺⁺

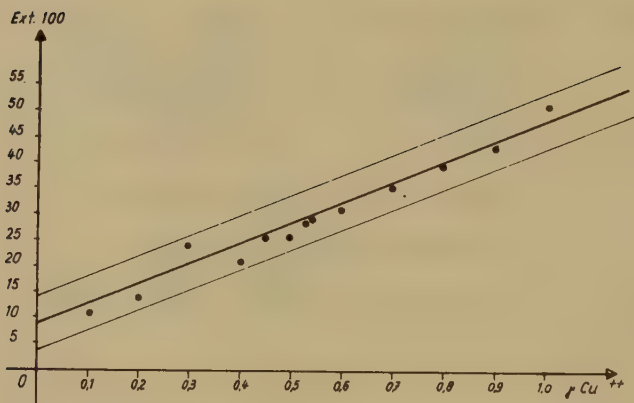


Abb. Nr. 12

Eichkurve 1—10 μ Cu⁺⁺

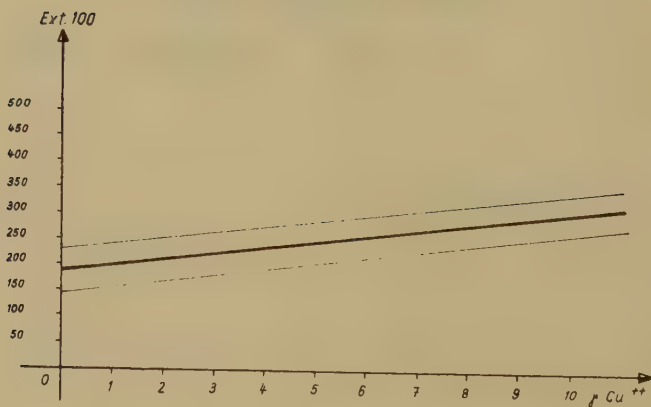


Abb. Nr. 13

b) Diskussion der Ergebnisse nach der Methode von EDEN und GREEN

Tabelle: Quantitative Kupferbestimmung

Substanz	$\mu\text{Cu}^{++}/100 \text{ mg}$	Max. Aufnahme
	Trockengewicht	$\mu\text{Cu}^{++}/100 \text{ mg}$ Trockengewicht
Spermatozoenkerne	0,28	-
Nukleoprotamin	7,38	-
Clupein (freie Base) 1938	10,4	-
Clupein (freie Base) 1959	19,86	44,7
Clupein-HCl I 1938	5,3	64,9
Clupein-HCl I 1959	3,4	61,0
Clupein-HCl II 1938	6,2	-
Clupein-HCl III 1959	3,5	62,5
Acetylclupein	-	74,27
Decarboxyliertes Clupein	-	2,76
DNS/I	4,16	-

Bei der Betrachtung der erhaltenen Kupfer-mengen aus Spermatozoenkernendes Herings nach EDEN und GREEN und der daraus gewonnenen Substanzen fällt auf, daß die Kupfer-mengen pro 100 mg Trockengewicht ansteigen. Es könnte angenommen werden, daß es zu einer Anreicherung des Kupfers durch die verschiedenen Präparationsschritte gekommen ist. Diese Annahme läßt sich durch zwei Überlegungen widerlegen. Einmal ist nicht einzusehen, warum es zu einer spezifischen Selektion des Kupfers aus einem Angebot vieler Metallionen kommen soll, zum anderen weisen die Untersuchungen über die maximale Aufnahme von Kupfer-¹ionen darauf hin, daß die Bindungskapazität des Clupeins bei weitem nicht erschöpft ist. Daraus muß man

schließen, daß beim Vorhandensein einer großen Zahl von freien Bindungskräften nicht das Überangebot eines Metalles die Aufnahme anderer Ionen ausschließt. So wird die Überlegung gefördert, daß dem Kupfer eine biologische Bedeutung zufallen könnte. Unsere Untersuchungen wurden nun darauf abgestimmt, nähere Aufschlüsse über den Kupfer-Protamin-Komplex zu erhalten. Am sichersten erschien uns der Weg, das Protaminmolekül so zu verändern, daß die funktionellen Gruppen für die Komplexbildung ausgeschaltet wurden. Durch die Einführung von Azetylresten in das Molekül ließ sich die Kapazität des Protamins gegenüber Kupfer nicht beeinträchtigen. Da die Azetylierung sowohl die Carboxylgruppen als auch die primären Aminogruppen erfaßt, werden die für die Komplexbildung in Frage kommenden Gruppen substituiert. Unsere Analysen ergaben, daß auch die eingeführten Carbonylgruppen zur Kupferbindung befähigt sind.

Durch die Einführung der Azetylreste kann sich folgender Komplex ausbilden:

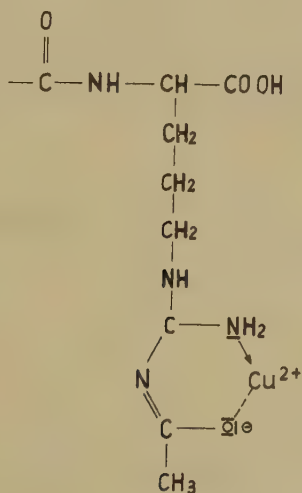


Abb.Nr. 14

Ausserdem decarboxylierten wir das Clupein mit N-Brom-succinimid. Aus diesem Versuch wollten wir Schlüsse auf das Ausmass intermolekularer Verknüpfungen ziehen. Es war nicht zu erwarten, dass die Bindungskapazität durch diesen Eingriff wesentlich erniedrigt werden konnte. Wie aus den Analysenergebnissen hervorgeht, ist aber die Kupferbindungsfähigkeit durch die Decarboxylierung tatsäächlich erniedrigt. Dieses Ergebnis weist darauf-hin, dass bei der Komplexbildung Protamin - Cu^{2+} ein grosser Anteil des Metalls eine Chelatbindung unter Einbeziehung der Carboxylgruppen eingeht.

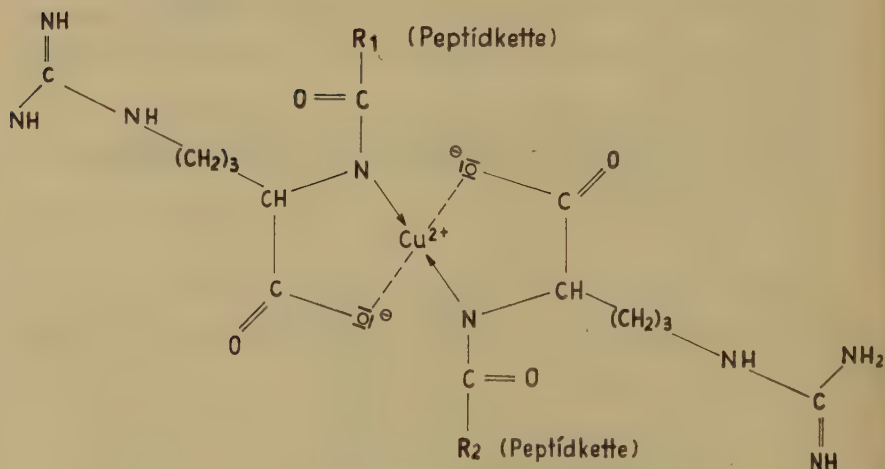


Abb. Nr. 15

c) Fraktionierung des Clupeins

Wie aus einer Reihe von Untersuchungen anderer Autoren bekannt ist, handelt es sich bei dem Clupein um ein heterogenes Gemisch von mindestens drei Fraktionen unterschiedlicher Molekülgrösse. Es konnte die Möglichkeit bestehen, dass einer dieser Fraktionen für die Komplexbildung verantwortlich ist. Über eine Aluminiumoxyd-Säule und mit Sephadex wurde das Clupein fraktioniert. Die erhaltenen drei Fraktionen wurden auf ihren Kupfergehalt untersucht und ihre maximale Aufnahmekapazität bestimmt. Bei der Trennung an Aluminiumoxyd erhält man Fraktionen, die frei von Kupfer sind, aber die gleiche Aufnahmekapazität wie das ungetrennte Clupein aufweisen. Es lässt sich kein Anhaltspunkt dafür finden, dass irgend-eine der Fraktionen besonders zur Komplexbildung neigt. Die gleichen Befunde zeigen Fraktionen, die durch Trennung an Sephadex erhalten wurden. Alle Fraktionen enthalten annähernd die gleichen Kupfermengen. Nur bei der Fraktionierung an Aluminiumoxyd kommt es zu einer Abtrennung der Metallionen

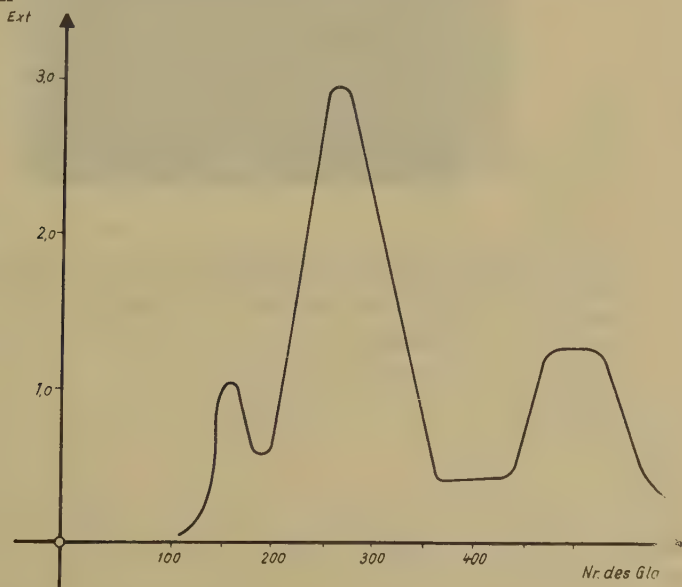


Abb. Nr. 16

Trennung von basischem
Clupein an einer
Sephadexsäule

d) Untersuchung des Protamins in der Tiselius-Elektrophorese

Diese Auftrennung des Clupeins in drei Fraktionen beobachten wir bei der elektrophoretischen Trennung unserer Präparate in einer Tiselius-Elektrophorese.

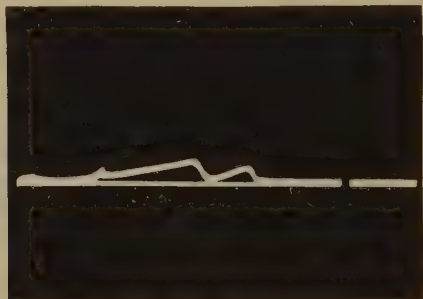


Abb. Nr. 17: 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base)
1938 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4° C;
10 mA; 950 V

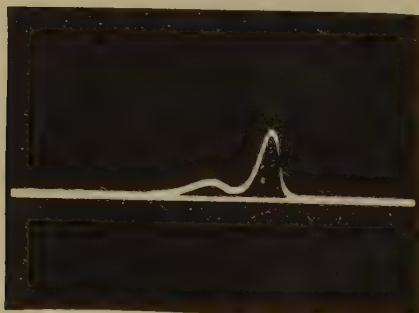


Abb. Nr. 18: 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base)
nach Behandlung mit Na-diäthylthiocar-
bamat.

4° C; 20 mA; 970 V

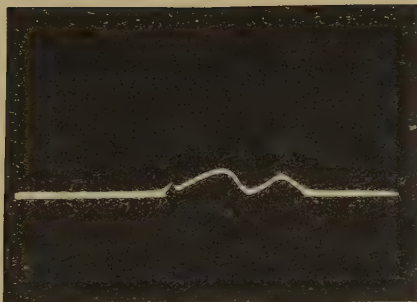


Abb. Nr. 19 : 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base)
nach Behandlung mit Na-diäthylthio-
carbammat und Zusatz von 10 μ Cu⁺⁺/100 mg
Trockengewicht.

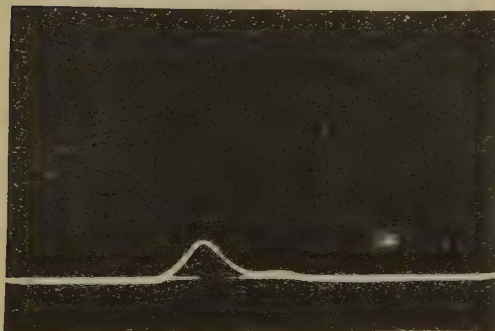


Abb. Nr. 20 : 1 %ige Lösung von Clupein-HCL III/1959
0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4⁰ C; 20 mA;
250 V.

Dabei bot sich uns die Möglichkeit, den Einfluss der Metallionen auf die intermolekulare Verknüpfung zu untersuchen. Wir entfernten das Kupfer aus dem Clupein durch Behandeln mit Na-diäthylthiocarbamat. Dabei veränderte sich das elektrophoretische Bild. Es sind nur noch zwei Gipfel zu beobachten, die annähernd einen Gauß'schen Kurvenverlauf zeigen. Die mittlere heterogene Fraktion ist nicht mehr zu beobachten. Wird den Präparaten Kupfer zugesetzt, lässt sich die vorher beschriebene Zahl der Fraktionen wieder herstellen. Wir halten dieses Ergebnis für einen starken Beweis, der für das Vorliegen von intermolekularen Komplexbildungen spricht. Allerdings kann daraus nicht der Schluss gezogen werden, dass diese Molekülverknüpfungen in der Zelle vorliegen und biologische Funktionen erfüllen. Es kann nur gesagt werden, dass die vorgefundenen Kupfermengen an einer Molekülverknüpfung in den gewonnenen Präparaten beteiligt sind.

Es ist schon erwähnt worden, dass wir unsere Protaminpräparate mit N-Bromsuccinimid decarboxylierten. Derartig behandelte Präparate wurden von uns in der Tiselius-Elektrophorese untersucht. Sie zeigten keine sichtbaren Veränderungen bei Entfernung oder Zugabe von Kupfer. Das elektrophoretische Bild ergibt eine am Anfang der Trennung fast symmetrische Kurve, die nach einiger Zeit in einzelne ungleiche Gipfel zerfällt. Hier an dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die schonend dargestellte Clupein-

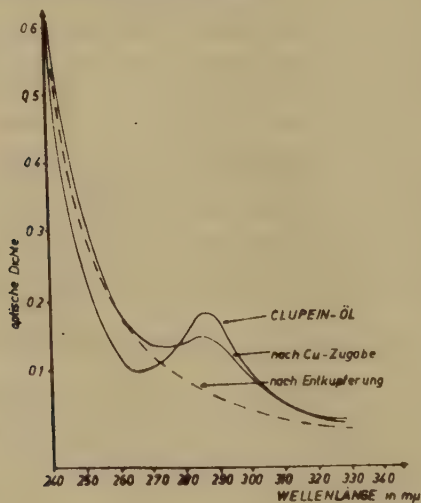
chargen kein CO_2 abspalten lassen, einen Kupfergehalt von 5 - 10 μg Cu pro 100 mg Trockensubstanz aufweisen, aber in ihrer Bindungskapazität noch nicht abgesättigt sind. Es ist denkbar, daß das Kupfer tatsächlich nur der Molekülverknüpfung dient und die beobachtete weitere Aufnahme absolut unphysiologisch ist.

e) Polarographischer Nachweis des Kupfers

Durch die angeführten Untersuchungen war uns bis jetzt nur der Nachweis gelungen, daß das Protamin befähigt ist, Kupferkomplexe zu bilden. Über die Wertigkeit des Metalls konnte keine Aussage gemacht werden. Der Nachweis mit Na-diäthylthiocarbamat erlaubt keine Differenzierung zwischen ein- und zweiwertigem Kupfer. Aus diesem Grunde überprüften wir unsere Kupferanalysen durch einen polarographischen Nachweis. Zu diesem Zwecke mußten die Proben verascht werden, ein Vorgang, der trotz der unterschiedlichen Halbstufenpotentiale der Wertigkeitsstufen des Kupfers, deren Trennung und quantitative Erfassung unmöglich macht. Die mit dieser Methode ermittelten Kupferwerte stimmten innerhalb einer zu erwartenden Fehlergrenze mit den Ergebnissen des Nachweises mit Na-diäthylthiocarbamat gut überein. Um eine Aussage über die Wertigkeit des metallischen Partners machen zu können, wurden Clupeinlösungen bei verschiedenen pH gegen kupferfreies Wasser dialysiert. Die Dialysate wurden eingeengt und polarographisch untersucht. Das im alkalischen Milieu gefundene Halbstufenpotential von $-0,25$ V besagt, daß nur zweiwertige Kupferionen im Dialysat vorliegen.

Nach den eingangs angeführten theoretischen Überlegungen über die Möglichkeit der Bildung von Chelatkomplexen war ein anderes Ergebnis auch nicht zu erwarten.

In Anlehnung an die Untersuchungen von H.R. MAHLER wurde der Kupfer-diäthylthiocarbamat-Komplex in Gegenwart des Clupeins photometrisch gemessen. Es liess sich das für kupferbindende Proteine typische Maximum der Absorption bei $450\text{ m}\mu$ gut nachweisen. Auch das Verhältnis der optischen Dichte bei 280 und $330\text{ m}\mu$ spricht dafür, dass ein tatsächlicher Komplex vorliegt.



- Abb. Nr.21 : a) Clupein (freie Base) 1938, 10 mg Substanz/
10 ccm Na_2CO_3 -Lösung.
b) 10 mg Substanz/10 ccm 1 %ige Na_2CO_3 -Lösung
+ 0,02 ccm Cu-Standardlösung.
c) 10 mg Substanz/10 ccm 1 %ige Na_2CO_3 -Lösung
+ Trichloressigsäure zur Fällung und wieder
mit Carbonatlösung aufgenommen.

f) Untersuchung der pH- und Temperaturstabilität des Komplexes

Nach den Untersuchungen über die Temperaturstabilität ist der Komplex unter physiologischen Bedingungen absolut stabil. Auch gegenüber pH-Veränderungen bleibt der Komplex unverändert.

Tabelle: Temperaturstabilität des Kupfer-Protamin-komplexes (Clupein-HCl III; 50 mg/10 ml; 1,75 μ Cu⁺⁺)

Temp. C°	Inkubationszeit (Stunden)	bestimmbare μ Cu ⁺⁺ -Menge	%
0°	8	0,05	2,85
24°	8	0,05	2,85
	24	0,09	5,10
	36	0,09	5,10
60°	8	1,0	57,14

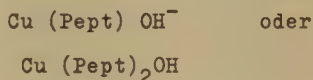
Tabelle: pH-Stabilität des Kupfer-Protamin-Komplexes (Clupein-HCl III/50 mg/10 ml; 1,75 μ Cu⁺⁺)

pH	freigesetzte Kupfermenge	% des Kupfergehaltes
1	1,5	85,71
2	1,2 - 1,5	68,57 - 85,71
3,2	0,9 - 1,0	51,42 - 57,14
5	0,5 - 0,7	28,57 - 40,00
7	0,01 - 0,03	0,571 - 1,71
8,1	0,6 - 0,8	34,28 - 45,71
10	1,5 - 1,6	85,71 - 91,42

Erst in unphysiologisch sauren und alkalischen Bereichen läßt sich der Komplex zerstören und das Kupfer im Dialysat nachweisen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß unter diesen Bedingungen eine Denaturierung des Protamins auftritt, die diesen Effekt primär verursachen wird. Wir wollten unsere Befunde über die Komplexbildung des Clupeins weiterhin absichern.

g) Bestimmung der Aktivität des Komplexes gegenüber p-Nitrophenylazetat

Durch Untersuchungen von W.L. KOLTUN ist bekannt, daß basische Komplexe der Formel



in der Lage sind, die Hydrolyse von p-Nitrophenylazetat zu beschleunigen. Wenn es sich bei unseren Präparaten um eine echte basische Komplexbildung handeln sollte, mußten Ansätze von Clupein eine nachweisbare Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylazetat zeigen. Tatsächlich ließ sich diese Erwartung bestätigen.

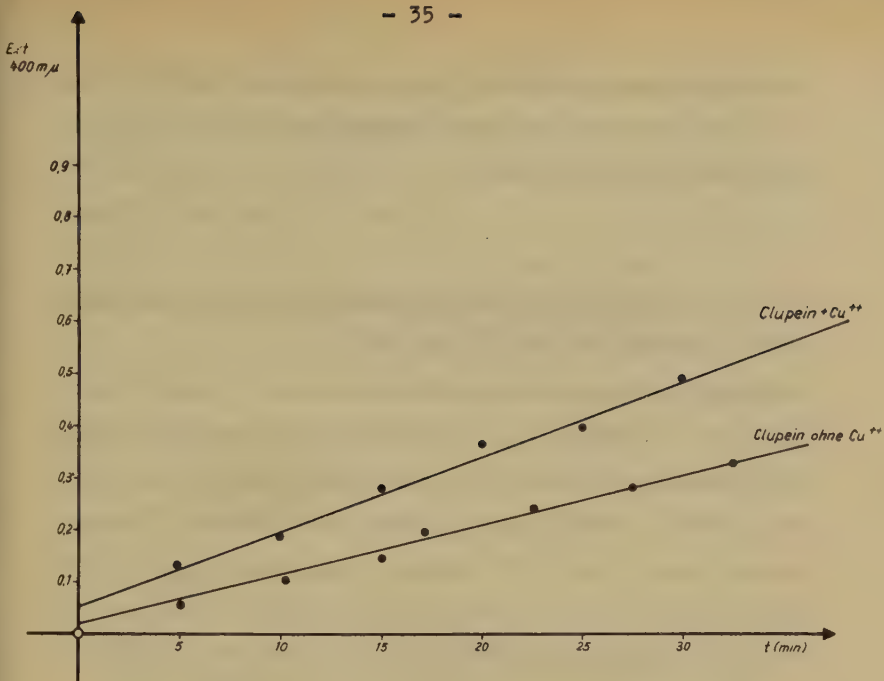


Abb. Nr. 22 : Einwirkung des Cu-Protamin-Komplexes auf die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat.

Die eingefügte Abbildung zeigt die gesteigerte Freisetzung von p-Nitrophenol gegenüber Protaminansätzen ohne Kupfer. Um zu prüfen, ob auch Protamin-Komplexe mit einwertigem Kupfer diesen Effekt zeigen, wurden Clupeinlösungen mit Natriumzyanid versetzt und gegen kupferfreies Wasser dialysiert. Die Protaminlösungen wurden zur Trockne eingeeengt und in äquimolaren Mengen in ihrem Verhalten gegenüber p-Nitrophenylacetat untersucht. Es liess sich nachweisen, dass die Präparate keine Aktivitätserhöhung gegenüber den Leerwerten von kupferfreiem Clupein zeigten. Auch diese

Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei den untersuchten Präparaten um einen echten Komplex mit zweiwertigem Kupfer handelt.

IV. Untersuchungen über die Rekombination von Nukleoprotamin unter dem Einfluss von Kupfer-Ionen.

Nachdem die Frage schon diskutiert wurde, ob die vorhandenen Kupfermengen zu intermolekularen Verknüpfungen herangezogen werden, musste eine andere Möglichkeit berücksichtigt werden. Aus unseren Untersuchungen über die Abspaltbarkeit des Clupeins durch Harnstoff hatte sich ergeben, dass ein Teil der Aminosäuren an der DNS verbleibt, während sich das Clupein auf diese Weise gut gewinnen lässt. Es mussten somit zwei Bindungstypen vorliegen. Es war denkbar, dass sowohl die Bindung der verbleibenden Aminosäuren als auch die elektrostatische Anlagerung des Clupeinmoleküls durch die Anwesenheit von Kupfer beeinflusst wird. Zu unserem Erstaunen liess sich in der von uns präparierten DNS eine Kupfermenge nachweisen, die annähernd mit der übereinstimmt, die im Nukleoprotamin aufgefunden wurde. Rechnet man die gefundenen Kupfermengen auf die prozentuale Beteiligung der DNS und des Clupeins bei der Bildung des Nukleoprotamins um, so zeigt sich, dass bei einem Verhältnis von 63 : 37 auf die DNS 2,6 μ Cu/100 mg und auf das Clupein 5,18 μ Cu/100 mg entfallen. Da für das Nukleoprotamin ein Kupfergehalt von 7,38 μ Cu/100 mg ermittelt

wurde, ergibt sich, dass sich das Kupfer anteilsgleich auf die beiden Bindungspartner verteilt. Aus diesem Grunde versprochen Rekombinationsversuche unter dem Einfluss von Kupfer einen Erfolg. Wir setzten zu gleichbleibenden Mengen DNS steigende Mengen Clupein zu und wiederholten die Versuche in Anwesenheit von Kupfer. Die beim Eingiessen in Wasser ausfallenden Nukleoprotamine wurden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und auf ihren Stickstoff- und Phosphorgehalt untersucht. Dabei liessen sich keine Unterschiede feststellen, so dass wir annehmen, dass die Bindung des Cluppeins an die DNS nicht durch Kupfer beeinflusst wird.

Tabelle: Rekombination von Nukleoprotamin unter dem Einfluss von Cu-Ionen.

Nr. des Versuches	mg DNS/1	mg Clupein-HCl (111)	μCu^{++}	Ausbeute in mg	N-Gehalt n. Kjeldahl	P-Gehalt n. Allen	μCu -Gehalt
1	180	40	-	80	19,35 %	5,64	- /100 mg
2	180	80	•	93	19,21 %	5,59	•
3	180	120	•	94	19,20 %	5,59	•
4	180	180	•	105	19,47 %	5,67	•
5	180	40	20	87	19,01 %	5,04	5,7
6	180	80	40	92	19,31 %	5,63	28,8
7	180	120	60	98	19,34 %	5,64	37,8
8	180	180	90	107	19,34 %	5,64	77,2

V. Zusammenstellung der Ergebnisse

1. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, das Nukleoprotamin und Protamin aus Heringsspermatozookernen schonend zu gewinnen.
2. Die Kupferbestimmung nach EDEN und GREEN wurde näher untersucht. Es liess sich nachweisen, dass die Methode zur Erzielung exakter Ergebnisse im pH stabilisiert werden muss. Nach unseren Ergebnissen ist ein pH von 7,0 am geeignetsten. Die sonst auftretenden Trübungserscheinungen werden auf ein Minimum reduziert.
3. Nach der verbesserten Methode von EDEN und GREEN wurden in den Heringsspermatozookernen und den daraus gewonnenen Präparaten folgende Kupfermengen gefunden:

Tabelle: Quantitative Kupferbestimmung

Substanz	$\mu\text{Cu}^{++}/100\text{mg}$	Max. Aufnahme
	Trockengewicht	$\mu\text{Cu}^{++}/100\text{ mg}$ Trockengewicht
Spermatozookerne	0,28	-
Nukleoprotamin	7,38	-
Clupein (freie Base) 1938	10,4	-
Clupein (freie Base) 1959	19,86	44,7
Clupein-HCl I 1938	5,3	64,9
Clupein-HCl I 1959	3,4	61,0
Clupein-HCl II 1938	6,2	-
Clupein-HCl III 1959	3,5	62,5
Acetylclupein	-	74,27
Decarboxyliertes Clupein	-	2,76
DNS/I	4,16	-

4. Die Clupeinpräparate wurden acetyliert. Die Kupferbindungsfähigkeit wurde dadurch nicht beeinflusst. Durch Decarboxylierung des Protamins wurde die Aufnahme des Kupfers erniedrigt.
5. Der Kupferkomplex des Protamins wurde auf seine pH- und Temperaturstabilität untersucht. Er erwies sich als absolut stabil innerhalb physiologischer Bereiche.
6. Mit Hilfe der Polarographie liess sich nachweisen, dass der Komplex nur von zweiwertigem Kupfer gebildet wird.
7. Das Protamin wurde an Aluminium- und Sephadexsäulen fraktioniert. Es liess sich nachweisen, dass alle Fraktionen zur Komplexbildung mit Kupfer befähigt sind.
8. Es wurde versucht, das Protamin in der Hochspannungselektrophorese zu trennen und mit alizarinblauen kupferbindenden Fraktionen nachzuweisen. Das Protamin konnte auf diesem Wege nicht getrennt werden. Das Kupfer war an der Front des wandernden Protamins nachzuweisen.
9. Das Protamin wurde in der Tiselius-Elektrophorese untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Kupfer zur Bildung intermolekularer Komplexe befähigt ist.
10. Der Kupfer-Protamin-Komplex wurde photometrisch untersucht. Das nach H.R. MAHLER für Kupfer bindende Protein

in Gegenwart von Na-diäthylthiocarbamat zu erwartende Maximum der Absorption bei $450\text{ m}\mu$ konnte nachgewiesen werden.

11. Entsprechend den Untersuchungen von KATCHALSKY zeigte das kupferhaltige Protamin eine erhöhte Aktivität gegenüber p-Nitrophenylacetat.
12. In Rekombinationsversuchen konnte gezeigt werden, dass das Kupfer keinen Einfluss auf die Nukleoprotaminbildung hat.

VI. Experimenteller Teil

Nachweisbar enthalten alle in der chemischen Praxis verwandten Stoffe und Lösungen geringe Mengen Kupfer. Um die Verunreinigung unserer Präparate bei den verschiedenen Arbeitsschritten zu vermeiden, wurden alle Lösungsmittel frisch destilliert und die benutzten Reagenzien soweit wie möglich umkristallisiert. Um das bidestillierte Wasser von Kupferverunreinigungen zu befreien, wurde das Wasser über einen gemischten Anionenaustauscher aus IR 120 und IRA 400 (1 : 2) gezogen. Ausserdem wurden alle Gefässe mit Parafilm abgedeckt, da dieses Material absolut kupferfrei ist.

1. Darstellung der Zellkerne aus Heringsspermatozoen

Die reifen Testikel von Heringen wurden im Jahre 1959 direkt aus dem Fischereihafen Hamburg bezogen. Die in Blechdosen verpackten Testikel wurden tiefgefroren und nach Bedarf verarbeitet. Dazu wurden die Testikel mechanisch zerkleinert und zu einem Brei verarbeitet. Der Brei wurde durch eine doppelte Lage Gaze filtriert und auf diese Weise von groben Gewebsbestandteilen befreit. Beim Einrühren des Filtrates in bidestilliertes Wasser, dem noch Titriplex zugegeben worden war, plasmolysierten die Zellen und die Kerne konnten bei 500 U/Min. abzentrifugiert werden.

Die erhaltene Kernmasse wurde noch zweimal in Wasser suspendiert und abzentrifugiert. Das so gereinigte Präparat wurde mit Alkohol und Äther entwässert und anschliessend an der Luft getrocknet.

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 19,65 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: 5,71 %

2. Darstellung des Nukleoprotamins

Portionen von je 2 g getrockneten Zellkernen aus Heringsspermatozoen wurden in 2 Liter 10 %iger NaCl-Lösung mit Titriplexzusatz 8 Stunden gerührt. Die Kerne gingen bis auf einen geringen Rest in Lösung. Vom Ungelösten wurde abzentrifugiert und der Überstand in dünnem Strahl unter kräftigem Rühren in destilliertes Wasser gegossen. Das Nukleoprotamin fiel in langen weissen Fäden aus, die sich leicht aus der Lösung isolieren liessen. Das erhaltene Material wurde noch zweimal in der gleichen Menge NaCl-Lösung gelöst und gefällt. Das gereinigte Nukleoprotamin wurde mit Alkohol und Äther getrocknet.

Ausbeute: 1,9 g

Stickstoff nach KJELDAHL: 19,51 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: 5,68 %

3. Darstellung des Clupeins als freie Base

2 g Nukleoprotamin wurden in 2 Liter 1o %iger NaCl-Lösung unter Rühren gelöst. Nach 4 - 5 Stunden hatte sich die Fasermasse gelöst. Die Lösung wurde scharf zentrifugiert und der Überstand von den geringen Verunreinigungen abgegossen. Durch Zusatz von unkristallisiertem NaCl wurde die Lösung gesättigt. Es bildete sich eine milchige Trübung, die bei 20 000 U/Min. in 30 Minuten abzentrifugiert werden konnte. Der Niederschlag wurde mit wenig Wasser aufgenommen und noch zweimal mit Kochsalz ausgefällt. Der so erhaltene Niederschlag wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 100 - 150 mg

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 24,41 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: neg.

4. Darstellung des Clupein-HCl I

2 g Nukleoprotamin wurden in 2 Litern 1o %iger NaCl-Lösung unter Rühren gelöst und 30 Minuten bei 5000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit festem NaCl gesättigt und die milchige Trübung bei 20 000 U/Min in 60 Minuten zum Absetzen gebracht. Der Niederschlag wurde mit wenig 5 %iger Trichlor-essigsäure aufgenommen, mit 2o %iger Essigsäure bis zur bleibenden Trübung versetzt. Die Trübung wurde sofort mit 5 000 U/Min. in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der so erhaltene Niederschlag wurde

mit 10 ml 0,02n HCl aufgenommen und mit frisch destilliertem Aceton gefällt. Nach mehrmaligem Umfällen wurde das Präparat gefriergetrocknet.

Ausbeute: 100 - 150 g

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 24,3 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: neg.

5. Darstellung des Clupein - HCl II

20 g Nukleoprotamin wurden mit 100 g gereinigtem Quarzsand in der Kugelmühle vermahlen. Das Mahlgut wurde mit 0,2 %iger HCl bei 4°C in mehreren kleinen Portionen unter langsamen Rühren extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und 30 Min bei 5 000 U/Min. in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der HCl-Extrakt wurde bis zur bleibenden Trübung mit frisch destilliertem Aceton versetzt. Nach 12-stündigem Stehen hatte sich der Niederschlag abgesetzt. Er wurde mit wenig destilliertem Wasser aufgenommen, mehrmals umgefällt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 900 - 1 000 mg

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 24,42 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: neg.

6. Darstellung des Clupein-HCl III

2 g Nukleoprotamin wurden in 2 Liter 10 %iger NaCl-Lösung gelöst und der Aansatz 5 Min. bei 5 000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit

20 g Harnstoff versetzt und 12 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Durch Zugabe von 1300 ml absolutem Alkohol wurde die DNS fädig ausgefällt und quantitativ aus der Lösung entfernt. Im Rotationsverdampfer wurde der Alkohol aus der Lösung entfernt und das Volumen auf 1,5 ml eingeengt. Durch Zugabe von festem NaCl wurde Clupein freigesetzt und abzentrifugiert. Der ölige Niederschlag wurde mit 0,02 n HCl aufgenommen und mit einem Überschuss Aceton gefällt. Nach zweimaligem Umfällen wurde das Präparat gefriergetrocknet.

Ausbeute: 350 mg

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 24,39 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: neg.

7. Darstellung der DNS aus dem Ansatz (6.)

Die aus dem Ansatz erhaltenen DNS-Fasermassen wurden noch zweimal in bidestilliertem Wasser mit Spuren von Ca-Ionen gelöst und mit Alkohol gefällt. Die so erhaltenen Präparate waren salzfrei und rein weiss. Sie wurden mit Alkohol und Äther vom Wasser befreit und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 1,5 g

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 15,45 %

Phosphorgehalt nach ALLEN: 8,9 %

8. Darstellung des Azetylclupeins

150 mg Clupein-HCl III wurden mit 6 ml Essigsäureanhydrid und 1 g frisch getrocknetem Natriumazetat 10 Minuten auf dem Wasserbad auf 90° C erwärmt.

Das Clupein ging nicht in Lösung und konnte relativ leicht als gelbliche Masse abfiltriert werden. Die Substanz wurde mit eiskaltem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 150 mg

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 21,34 %

9. Darstellung des decarboxylierten Clupeins

a) Darstellung des N-Bromsuccinimid

(Y. Yukawa, U. Suzuki, Inst. Sci. Ind. Research
Osaka Univ. 10, 190 (1953))

10 g Succinimid und 4 g NaOH wurden in 10 ccm Wasser gelöst und im Eisbad unter Rühren mit einer Lösung von 16 g Brom in 35 ccm Wasser tropfenweise versetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und aus heißem Wasser dreimal umkristallisiert.

Ausbeute: 11,2 g

Schmelzpunkt: 177° C

Decarboxylierung:

Als Puffer benutzten wir einen 0,1 m Natrium-phosphatpuffer vom pH 7,0, zum Abfangen des HBr eine 40 %ige KJ-Lösung und weiterhin eine 20 %ige Succinimid-Pufferlösung.

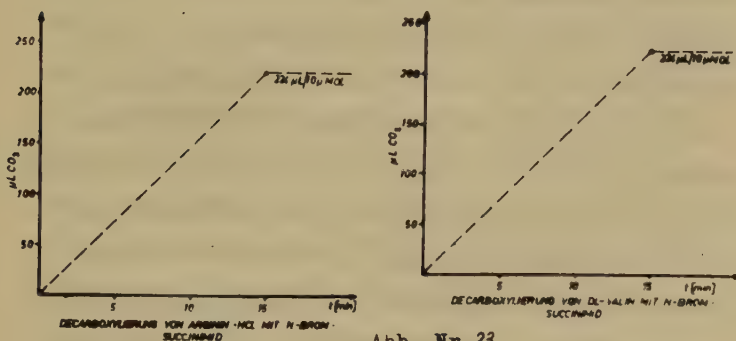


Abb. Nr.23

Das Volumen des entwickelten CO₂ wurde im Warburg-Apparat bestimmt. In das Zentralgefäß wurden 0,3 ccm 40 %iger KJ-Lösung gegeben, in den Seitenarm 0,5 ccm der zu untersuchenden Lösung, in das Hauptgefäß 2,2 ccm 20 %iger Succinimid-Pufferlösung und 2 mg N-Bromsuccinimid. Nach 20 Minuten Equilibrieren wurde die zu untersuchende Lösung eingekippt.

Temperatur: 25° C

Zur Kontrolle und zur Eichung der Gefäße und des Manometers wurden Ansätze von Arginin-HCl und DL-Valin mit N-Bromsuccinimid decarboxyliert (Siehe Abb. 13).

b) Decarboxylierung des Clupein-HCl III

100 mg Clupein-HCl III wurden in 25 ml 0,1 m Natriumphosphatpuffer pH 7 gelöst und mit 5 ml 20 %iger Succinimid-Pufferlösung versetzt. Zu dem Ansatz wurden 5 mg kristallines N-Bromsuccinimid zugegeben und die Decarboxylierung bei 37°C durchgeführt. Nach 60 Minuten zeigte eine Probe im Warburg-Apparat keine CO₂-Spaltung mehr an. Der Ansatz wurde mit frisch destilliertem Azeton bis zur bleibenden Trübung versetzt und scharf zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch zweimal umgefällt und zur weiteren Reinigung über eine Sephadex-Säule gezogen. Das Eluat wurde bei 220m μ photometrisch gemessen, gesammelt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 80 mg

Stickstoffgehalt nach KJELDAHL: 23,13 %

Tabelle: Ergebnisse der Decarboxylierung von Nukleoprotamin und Clupeinpräparaten

Substanz	$\mu\text{L CO}_2/10 \text{ mg}$ Substanz	errechnetes Molgewicht
Nukleoprotamin	-	-
Clupein (freie Base)	-	-
Clupein (freie Base) entkuppert	51,97	4310
Clupein-HCl I	54,61	5410
Clupein-HCl II	-	-
Clupein-HCl III	-	-

Fraktionierung von Clupeinpräparaten an einer

Al₂O₃-Säule

Es wurde eine Säule mit einer Gesamtlänge von 30 cm und einer lichten Weite von 1 cm benutzt. Als Säulenfüllung erwies sich basisches Al₂O₃, standardisiert (n. Brockmann), am geeignetsten. Als Puffer benutzten wir Natriumphosphatpuffer pH 7,2, von 0,02 molar auf 0,3 molar ansteigend. Der Durchfluss des Puffers wurde so reguliert, dass nach 16 Stunden 300 ccm des 0,02 molaren Puffers durch 600 ccm des 0,3 molaren Puffers kontinuierlich ersetzt und durchgelaufen waren. Mit dem Fraktionsschneider wurden Volumen von 4 ccm pro Reagenzglas aufgefangen. Die maximale Substanzmenge für diese Säulengrösse betrug 40 mg.

Durchführung:

Das Aluminiumoxyd wurde dreimal mit je 75 ccm 0,02 molaren Puffers gewaschen und in die Säule eingeschlemmt. Die Substanz wurde in 5 ccm desselben Puffers gelöst und auf die Säule gebracht. °
Danach wurde mit dem Durchlauf des 0,02 molaren Puffers begonnen, der in der Geschwindigkeit des Abflusses unter Rühren kontinuierlich mit dem 0,3 molaren Puffer versetzt wurde. Zur Ermittlung der Fraktionen wurde jedes Reagenzglas im Zeiss-photometer bei 220 m μ gemessen und von jedem Glas Tüpfelproben auf Chromatographiepapier mit Amidoschwarz angefärbt.

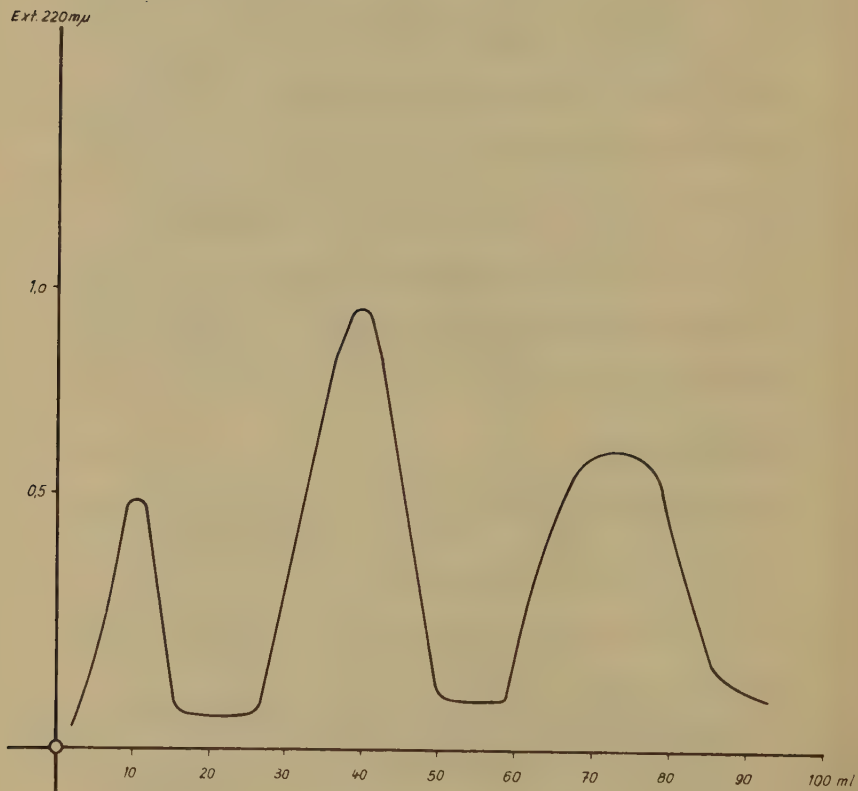


Abb. Nr. 24 : Aluminiumoxyd-Säule Clupein (freie Base),
1938

Zur Untersuchung der Fraktionen des basischen Clupeins wurde der Puffer gegen einen flüchtigen Ammoniumcarbonatpuffer gleicher Molarität ausgetauscht, der durch Einleiten von CO_2 auf das gewünschte pH gebracht wurde.

Die gesammelten Fraktionen wurden gefriergetrocknet und auf den Kupfergehalt mit Matriumdiäthylthiocarbamat untersucht. Bei keiner der Fraktionen liess sich Kupfer nachweisen. Da angenommen werden musste, dass bei dem Durchlauf des Protamins durch die Säule das Kupfer zurückgehalten wurde, wiederholten wir die Versuche mit dem Dextran-Gel Sephadex.

10. Fraktionierung von Clupeinpräparaten an einer SEPHADEX-Säule (Gel-Filtration)

Sephadex G-25 und G-50 wurde mit 0,05 molarer NaCl-Lösung gut gewaschen und in Säulen 3,5 . 75 cm eingeschlemmt. Nach dem Durchlaufen von je 5 Litern destilliertem Wasser waren die Säulen ionenfrei gewaschen. Die Säulen wurden mit je 5 ccm einer 50 mg Substanz enthaltender wässriger Lösung beschickt. Nach dem Eindringen der Lösung wurde mit 10 ccm destilliertem Wasser nachgewaschen. Als Eluationsmittel benutzten wir ebenfalls destilliertes Wasser. Portionen von je 4 ccm wurden mit dem Fraktionsschneider aufgefangen. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt und der Durchlauf des Eluationsmittels auf 16 ccm/Stunde eingestellt. Zur Kontrolle der Fraktionierung wurden die aufgefundenen Volumen bei 216 und 225 $\text{m}\mu$ photometriert. Gleichzeitig wurden in der Reihenfolge der

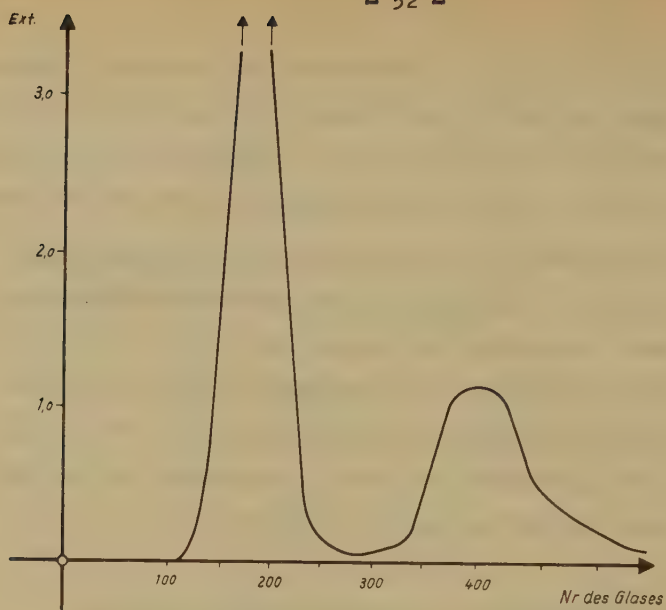


Abb. Nr. 25 : Clupein-HCl (III)

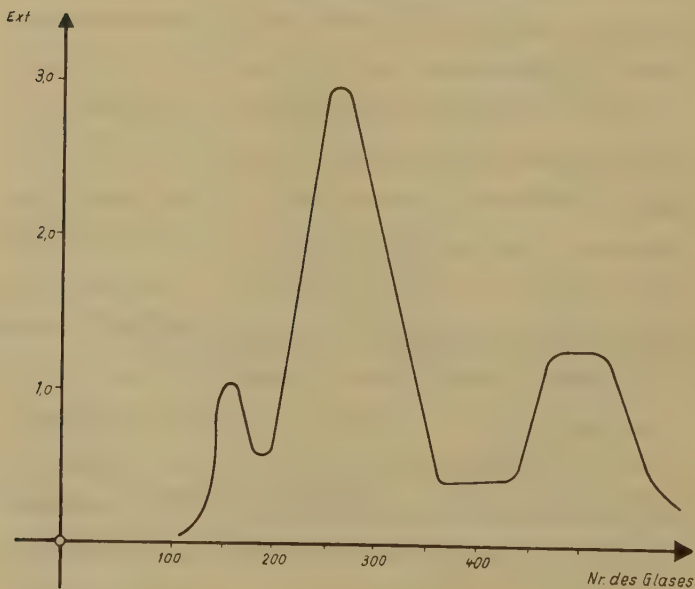


Abb. Nr. 26 : Clupein-HCl (III)

Reagenzgläser Proben auf Chromatographiepapier mit Amidoschwarz und Ninhydrin angefärbt (siehe Abb. 2).

11. Untersuchung des Clupeins in einer Elektrophorese-Apparatur nach Tiselius

Wir benutzten eine transportable Apparatur der Firma American Instrument Company, Typ Nr. 5-8500. Das elektrische System hatte eine regulierbare Spannung von 50 - 900 Volt bei einer Stromstärke von 5 - 28 mA. Die Maximalleistung betrug 16 Watt. Das Temperatursystem ermöglichte das Arbeiten bei einer Temperatur von $20^{\circ} \text{C} \pm 0,2 \%$. Die benutzten Silberchloridelektroden tauchten in je 5 ccm einer 5 n KCl-Lösung, über die der Puffer mit einem Durchschnittsvolumen von 400 ccm geschichtet wurde. Das optische System entsprach der Methode Thovert-Philpot-Svenson mit einer horizontalen Vergrößerung von 1 : 2.

Durchführung der Versuche:

Es wurden 1 oder 2 %ige Clupeinlösungen benutzt, von denen 8 - 10 ccm in den optischen Teil der Zelle gegeben wurden. Die Zelle wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und an die Versuchstemperatur angeglichen.

Vor Beginn der Trennung wurde der Gradient nachträglich mit einer Kapillare geschärft. Maximale Versuchsdauer: 2 Stunden.

Zur Auswertung der Versuche wurden in regelmässigen Zeitabständen Aufnahmen vom absteigendem Ast der Zelle angefertigt.

Aus den Abbildungen der elektrophoretischen Trennung des Clupeins kann man ersehen, dass ein Gemisch von mindestens 3 Fraktionen vorliegen muss. Die mittlere Fraktion zeigt einen Kurvenverlauf, der dafür spricht, dass sich diese Fraktion bei längerer Laufzeit weiter auftrennt. Wird das Clupein mit Na-diäthylthiocarbamat behandelt, verändert sich das Elektrophoresebild. Es entsteht ein einheitlicheres Bild, denn die Fraktion mit grösster Wanderungsgeschwindigkeit verschwindet, die mittlere Fraktion nimmt einen Gauß'schen Kurvenverlauf an und die Konzentration der Fraktion mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit steigt auffällig an. Man kann diese Beobachtung so deuten, dass durch die Anwesenheit des Cu intermolekulare Verknüpfungen entstehen, die die oben beschriebene Auftrennung des unbehandelten Clupeins in 3 Fraktionen verursacht. Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, dass die 2 Fraktionen sich bei Cu-Zusatz wieder in 3 Fraktionen auflösen. Unsere Clupeinpräparate, die wir nur mit Cu-freien Reagenzien und Lösungsmitteln darstellten, wie z. B. das mit Harnstoff vom Nukleoprotamin abgetrennte Clupein-HCl III, enthielten keine nachweisbaren Cu-Mengen und zeigten in der Elektrophorese eine Auftrennung in nur 2 Fraktionen.

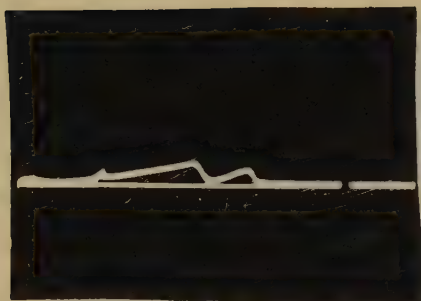


Abb. Nr. 27: 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base)
1938 0,1 m Phosphatpuffer pH 7
4° C; 10 mA; 950 V

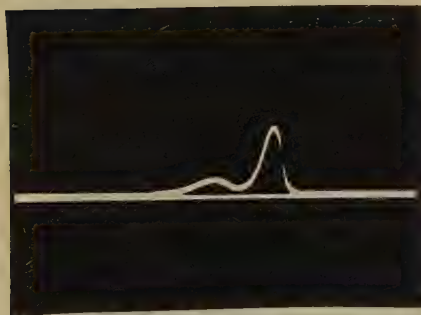


Abb. Nr. 28 : 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base)
nach Behandlung mit Na-Diäthylthio-
carbamat.
4° C; 20 mA; 970 V

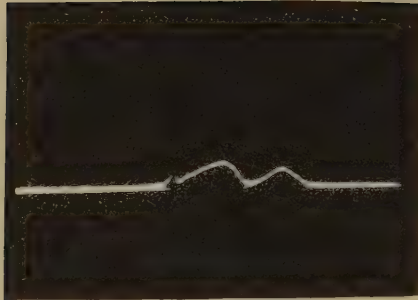


Abb. Nr. 29: 1 %ige Lösung von Clupein (freie Base) nach
Behandlung mit Na-diäthylthiocarbamat und
Zusatz von 10 Cu^{++} / 100 mg Trocken-
gewicht.



Abb. Nr. 30: 1 %ige Lösung von Clupein-HCl III/ 1959
0,1 m Phosphatpuffer pH 7.4⁰ C; 20 mA;
250 V.

12. Quantitative Kupferbestimmung nach EDEN und GREEN

- a) Zur Einarbeitung in die Bestimmung des Cu mit Na-diäthylldithiocarbamat wurde das Absorptionsmaximum des entstehenden Komplexes bestimmt. Entsprechend den Angaben in der Literatur liegt das Maximum bei $430 \text{ m}\mu$ (Abb. 3/). Aus diesem Grunde wurde die Cu-Menge an Hand des gebildeten farbigen Komplexes mit dem Zeissphotometer bei $450 \text{ m}\mu$ bestimmt. Es war für uns von Wichtigkeit zu wissen, in welcher Geschwindigkeit der Komplex ausbleicht, da eine Routineuntersuchung von mehreren, gleichzeitig anfallenden Proben zeitliche Verzögerungen in sich einschliesst. Aus diesem Grunde wurde die Ausbleichungsgeschwindigkeit des gebildeten Farbkomplexes bestimmt. Es stellte sich heraus, dass ohne pH-Kontrolle eine Extinktionsabnahme mit einer Geschwindigkeit von $t/2 = 15 \text{ Min.}$ einzubeziehen ist. Wir wiederholten unsere Versuche unter konstanten pH-Bedingungen (Abb. 32/33). Wir fanden, dass die günstigsten Werte bei einem eingestellten pH von 7,0 zu erzielen waren. Geringfügige Abweichungen im sauren oder alkalischen Bereiche erhöht die Ausbleichungsgeschwindigkeit. Erschwerender ist aber die Beobachtung, dass die erwähnten pH-Veränderungen zu einer beschleunigten Eintrübung des Amylalkoholextraktes führen. Selbst Zentrifugieren oder Filtrieren vermag diesen Fehler nicht auszugleichen. Als Arbeitsbedingung legten wir darauf hin folgende Einschränkung fest:

- a) Alle Bestimmungen werden bei pH 7,0 durchgeführt.
- b) Nach der Zugabe des Na-diäthylldithiocarbamats wird 10 Minuten gleichmässig geschüttelt und nach Trennung der beiden Phasen der Amylalkohol-extrakt abpipettiert und durch Cu-freies Papier filtriert.

b) Eichkurve

Um Anhaltspunkte über den Bestimmungsbereich und die Nachweisgrenzen zu erhalten, wurden Eichkurven im Bereich von 0,1 - 1,0 μ und 1,0 - 10 μ Cu aufgestellt. Dazu benutzten wir eine Stammlösung mit 0,3928 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, der einige Tropfen H_2SO_4 zugesetzt waren. Die Lösung enthielt 0,1 μ /ml Cu. Es wurden Reagenzgläser mit steigenden Cu-Mengen beschickt mit Puffer auf 4 ml aufgefüllt, je Glas 4 ml Amylalkohol und 0,5 ml einer 0,5 %igen Na-diäthylldithiocarbamatlösung zugesetzt. Die Ansätze wurden 10 Min. gleichmässig geschüttelt, durch ein Cu-freies Filter filtriert und im Zeißphotometer bei 450 $m\mu$ die Extinktion bestimmt. (Abb. 34/40).

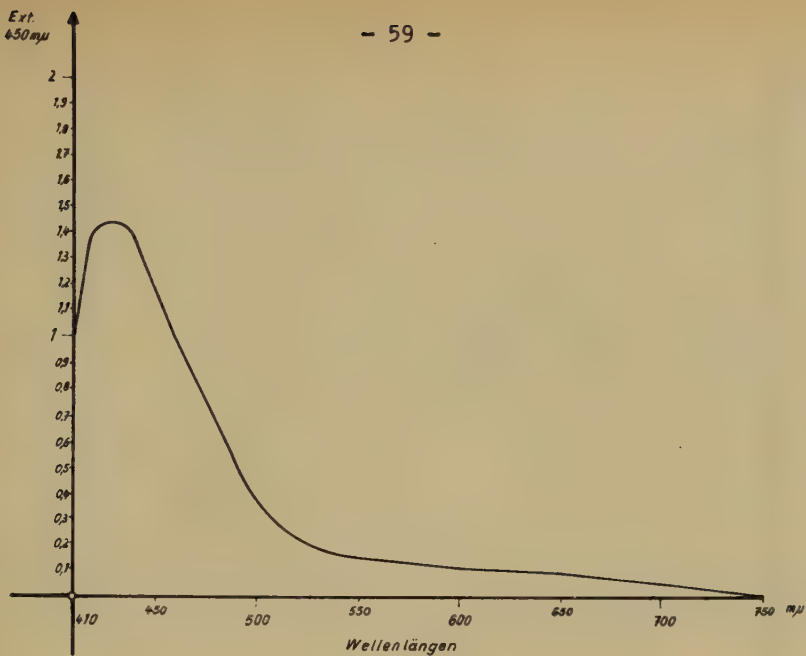


Abb. Nr. 31 : Absorptionsmaximum des Cu-diäthyl-
dithiocarbamat-Komplexes

Ext.
450 mμ

- 60 -

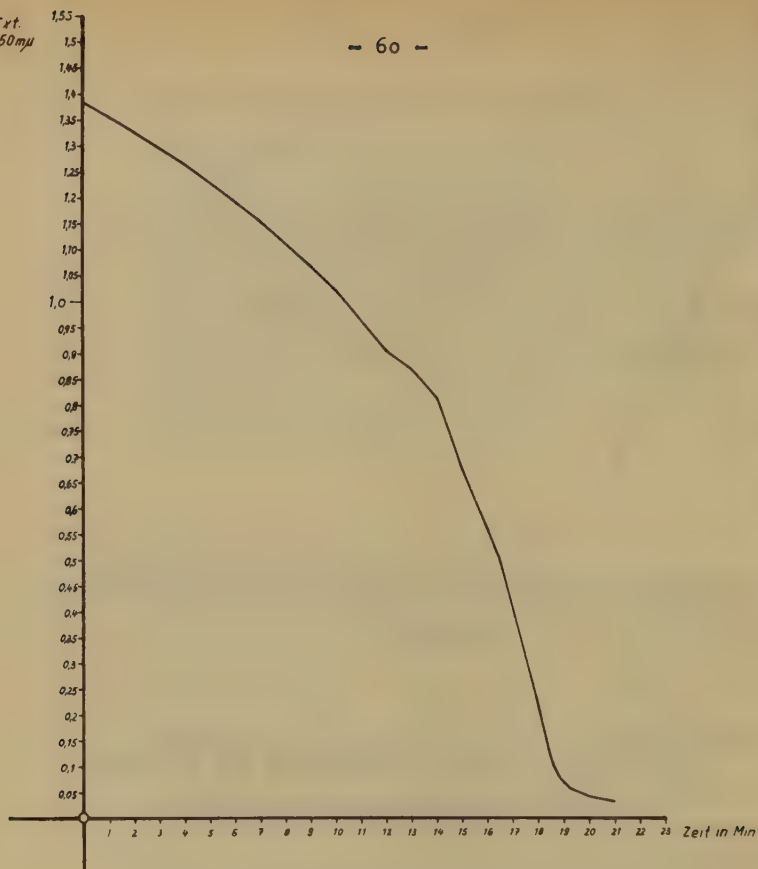


Abb. Nr. 32 : Ausbleichung des Cu-Diäthylthiocarbamat-Komplexes bei unverändertem pH
($t/2 = 15$ Min.)

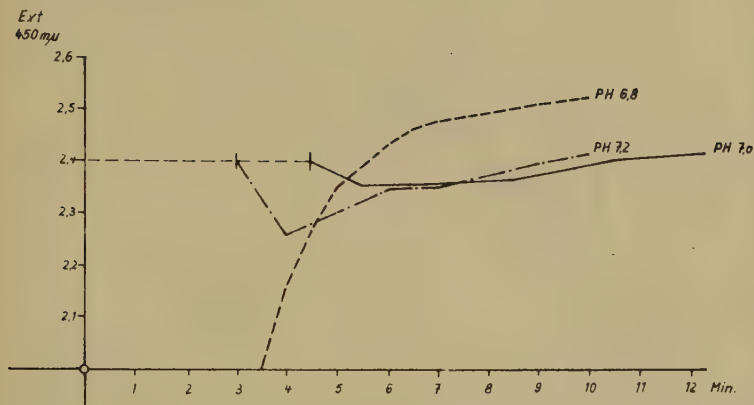


Abb. Nr. 33 : Darstellung des Bildungsverlaufes des
Cu-Diäthylthiocarbamat-Komplexes bei
verschiedenem pH.

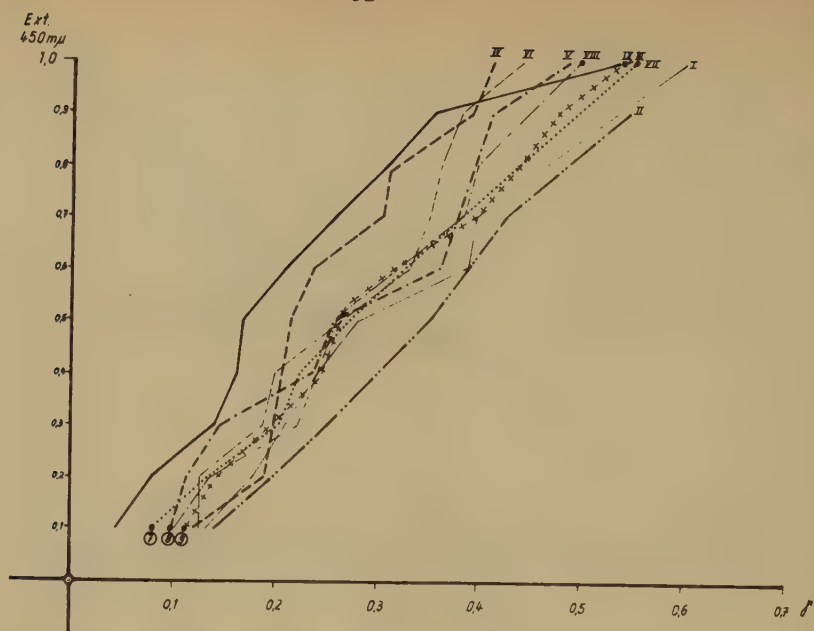


Abb. Nr. 34 : Einzelmessungen für die Eichkurve in
der Konzentration von 0,1 - 1,0% Cu

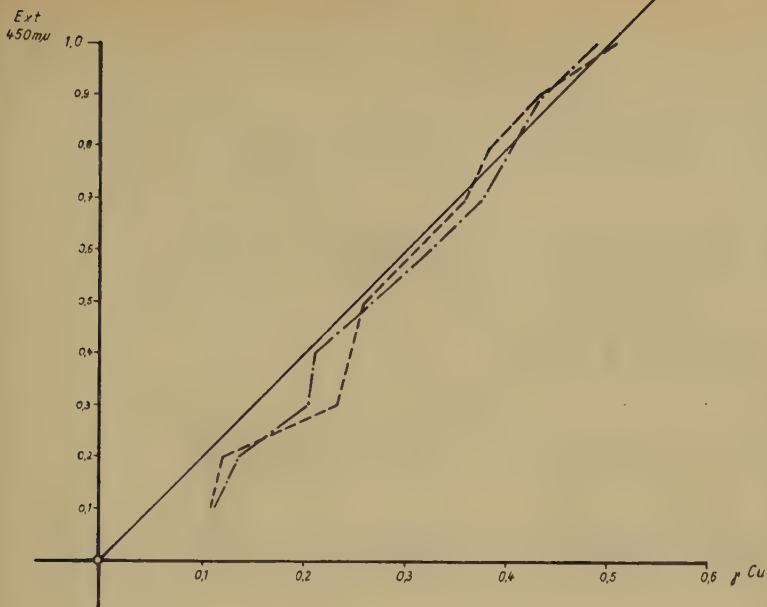


Abb. Nr. 35 : Nach den Durchschnittswerten der steigenden Konzentration von 0,1 - 1,0 μ Cu aufgestellte Eichkurve.

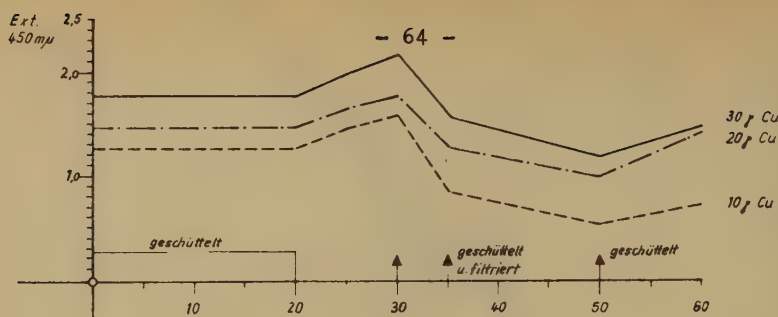


Abb. Nr. 36 :

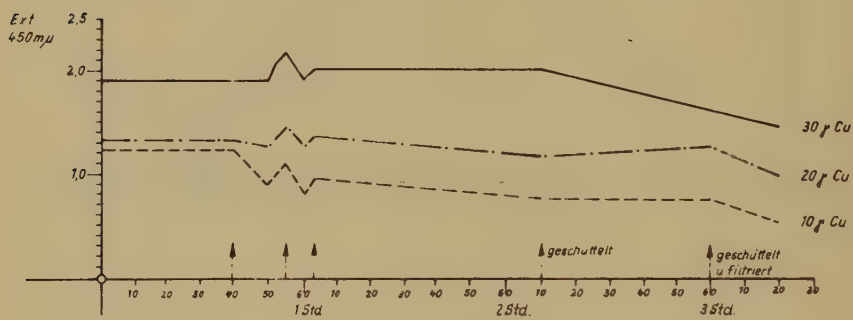


Abb. Nr. 37 :

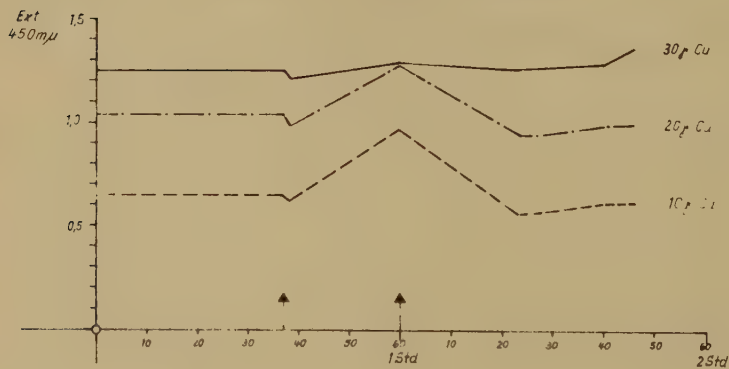


Abb. Nr. 38 :

Eichkurve 0,1—1,0 μ Cu⁺⁺

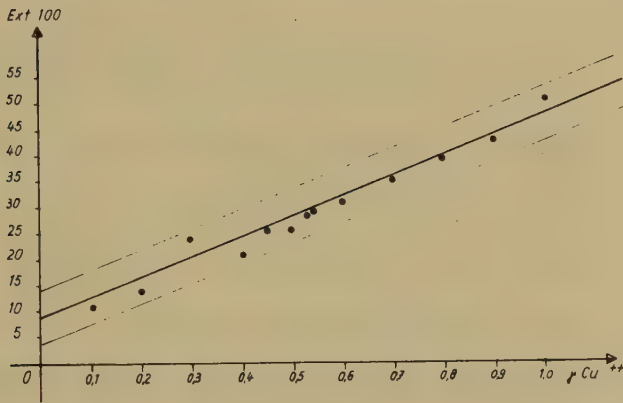


Abb. Nr. 39

Eichkurve 1—10 μ Cu⁺⁺

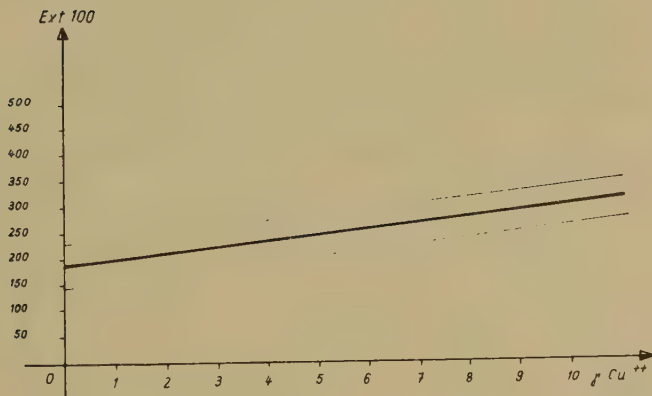


Abb. Nr. 40

c) Kupferbestimmung der Clupeinpräparate

30 - 50 mg Substanz wurden in einen Kjeldahlkolben eingewogen und mit 1 ccm konz. Schwefelsäure und 3 ccm Perchlorsäure 30 Minuten erhitzt. Nach kurzem Abkühlen der Kolben wurden 3 ccm Salpetersäure zugesetzt und so lange erhitzt, bis das Gesamtvolumen ungefähr 1 ccm betrug. Das Veraschungsgemisch wurde quantitativ in einem Meßzylinder mit Schliffstopfen gespült und das Volumen mit destilliertem Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 ccm einer 4 %igen Natriumpyrophosphatlösung und 5 ccm konz. Ammoniaks wurde mit 4 ccm Amylalkohol überschichtet. Nach Zugabe von 0,5 ccm einer 0,5 %igen Natriumdiäthyl-dithiocarbamatlösung wurde gleichmässig zehn Minuten geschüttelt, der Amylalkohol abpipettiert, filtriert und bei 450 m μ gemessen.

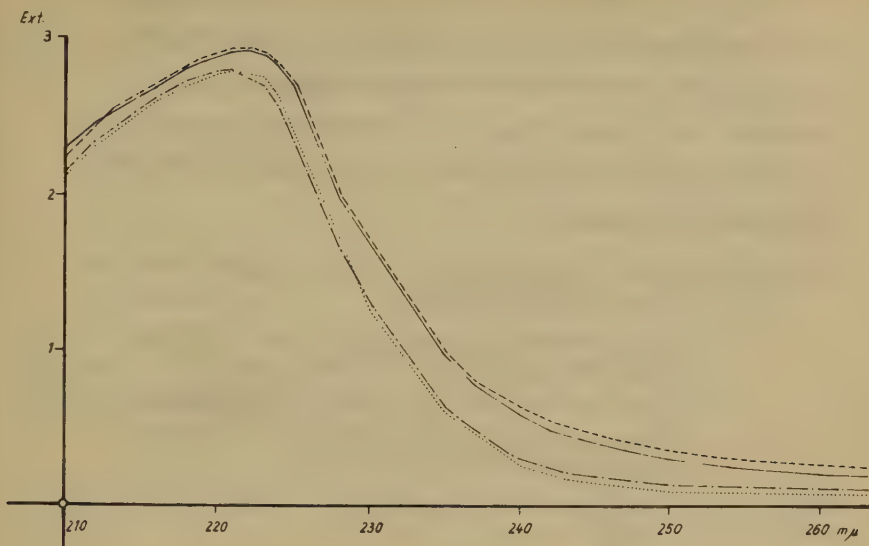


Abb. Nr. 41 : Absorptionsmaximum des Clupeins

Photometrische Untersuchung des Kupfer-Protamin-Komplexes

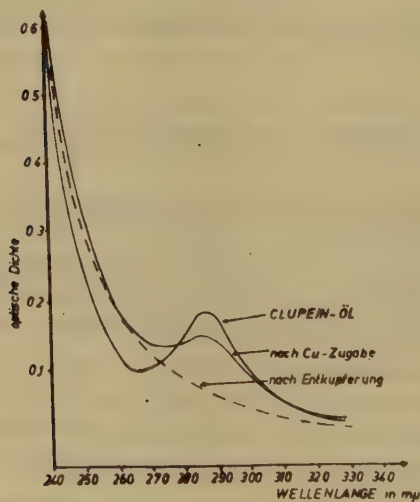
Es musste angenommen werden, dass der Kupfer-Gehalt die Absorptionskurven des Clupeins verändert. Aus diesem Grunde haben wir unsere Präparate in einem Bereich von 210 - 350 $m\mu$ photometrisch gemessen (Abb. Nr. 27). Es liess sich keine Veränderung nachweisen, auch acetyliertes und decarboxyliertes Clupein zeigen die gleichen Absorptionsmaxima. Wird zur Lösung des Protamins Na-diäthylthiocarbamat zugesetzt, entsteht ein neues Absorptionsmaximum bei 285 $m\mu$, das zum Nachweis des gebundenen Kupfers herangezogen werden kann.

10 mg Substanz wurden in 10 ccm einer 1 %igen Natriumcarbonatlösung gelöst, mit 0,5 ccm einer 0,5 %igen Na-diäthylthiocarbamatlösung versetzt und gegen einen Leerwert von 10 ccm 1 %iger Natriumcarbonatlösung, 0,02 ccm Cu-Standardlösung und 0,5 ccm 0,5 %iger Na-diäthylthiocarbamatlösung gemessen.

Abb. 42 a) Clupein (freie Base)/1938, 10 mg Substanz/
10 ccm Na_2CO_3 -Lösung.

b) 10 mg Substanz/10 ccm 1 %ige Na_2CO_3 -Lösung
+ 0,02 ccm Cu-Standardlösung.

c) 10 mg Substanz/10 ccm 1 %ige Na_2CO_3 -Lösung
+ Trichloressigsäure zur Fällung und wieder
mit Carbonatlösung aufgenommen.



Nach den Untersuchungen von H.R. MAHLER und Mitarbeitern gibt nur der Cu-diäthylthiocarbamat-Komplex in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cu-bindenden Proteinen das Maximum der Absorption im charakteristischen Bereich von $450 \text{ m}\mu$. Nach der Extraktion des Cu-Chelates ist das Maximum verschwunden.

Nach denselben Autoren ist das Verhältnis der optischen Dichte bei 280 m μ und 330 m μ für alle Cu-Proteine niedrig, für alle anderen Proteine hoch.

$$\text{basisches Clupein, } E_{280} : E_{330} \frac{0,082}{0,028} = 2,9$$

$$\text{basisches Clupein, } E_{280} : E_{330} \frac{0,108}{0,018} = 6,0$$

(entkupfert)

Das Maximum der Absorption bei 290 m μ geht erst nach Trichloressigsäurefällung verloren.

Tabelle: Quantitative Kupferbestimmung

Substanz	$\mu\text{Cu}^{++}/100 \text{ mg}$	
	Trockengewicht	Max. Aufnahme $\mu\text{Cu}^{++}/100 \text{ mg}$ Trockengewicht
Spermatozoenkerne	0,28	-
Nukleoprotamin	7,38	-
Clupein (freie Base) 1938	10,4	-
Clupein (freie Base) 1959	19,86	44,7
Clupein-HCl I 1938	5,3	64,9
Clupein-HCl I 1959	3,4	61,0
Clupein-HCl II 1938	6,2	-
Clupein-HCl III 1959	3,5	62,5
Acetylclupein	-	74,27
Decarboxyliertes Clupein	-	2,76
DNS/I	4,16	-

Polarographische Kupferbestimmung

Zur Kontrolle der Werte, die nach der Methode von EDEN und GREEN mit Natriumdiäthylthiocarbamat erhalten werden, untersuchten wir die Präparate gleichzeitig in einem Polarographen der Firma A. Kuntze, Düsseldorf, Modell POL 3. Das Halbstufenpotential des Kupfers in sauren Lösungen beträgt für die Reduktion $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}$ - 0,03 V, in ammoniakalischen Lösungen zeigen sich zwei Stufen, diejenigen der Reduktion $\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^+$ bei - 0,25 V und der Reduktion $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}$ bei 0,58 V. Wir entschlossen uns, die Kupferbestimmung im ammoniakalischen Milieu durchzuführen, um aus den zu erhaltenden Halbstufenpotentialen Rückschlüsse auf die Wertigkeit des vorhandenen Kupfers ziehen zu können.

Veraschung des Materials

10 bis 50 mg über P_2O_5 getrocknetes Clupein wurden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 10 ml konzentrierter Salpetersäure und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure auf dem Sandbad erwärmt. Nach dem Einengen der Flüssigkeit bis zur sirupartigen Konsistenz wurden 5 ml Perchlorsäure zugegeben. Der Trockenrückstand wurde mit 1 n NH_3 / 1 n NH_4Cl -Lösung aufgenommen und quantitativ in ein 10 ml-Meßkölbchen gespült. Zur polarographischen Analyse wurden die Proben in einem Becherglas 10 Minuten mit Stickstoff begast und in demselben Gefäß untersucht.

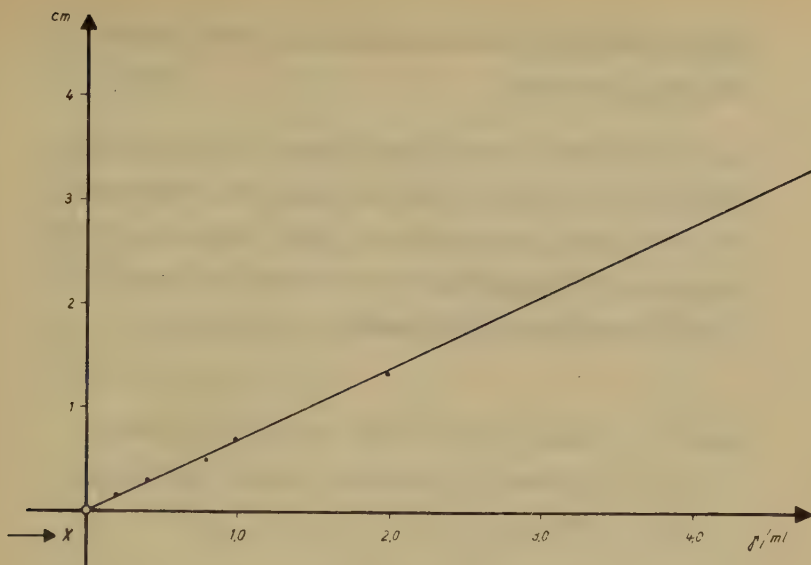


Abb. Nr. 43 : Eichkurve für die polarographische
 $g\ Cu^{++}$ - Bestimmung

Aufstellen einer Eichkurve :

zu 10 ml ammoniakalischen Lösungsmitteln wurden Proben von 0,1 bis 10 $g\ Cu^{++}$ zugesetzt, in dergleichen Weise 10 Minuten mit Stickstoff begast und polarographiert. Die mit der Polarographie ermittelten Kupfermengen stimmen mit denen der Natriumdiäthylthiocarbamat-Methode innerhalb geringfügiger Fehlergrenzen überein.

Untersuchung der Temperaturstabilität des Kupfer-
Protamin-Komplexes:

10 ml aliquoter Proben Clupeinlösung in Natriumphosphatpuffer pH 7 wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Proben direkt mit Natriumdiäthylthiocarbamat ausgeschüttelt, um die freigesetzte Kupfermenge zu bestimmen.

Tabelle: Temperaturstabilität des Kupfer-Protamin-Komplexes (Clupein-HCl III; 50 mg/10 ml; 1,75 μ Cu⁺⁺)

Temp. C°	Inkubationszeit (Stunden)	bestimmbare μ Cu ⁺⁺ -Menge	%
0°	8	0,05	2,85
24°	8	0,05	2,85
	24	0,09	5,10
	36	0,09	5,10
60°	8	1,0	57,14

Untersuchung der pH-Stabilität des Kupfer-Protamin-
Komplexes:

10 ml von Clupeinlösungen (5 mg/ml) mit verschiedenem pH wurden mehrere Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und gegen Puffer des gleichen pH dialysiert.

Anschliessend wurden die Proben auf pH 7 gebracht und das Kupfer mit Natriumdiäthylthiocarbamat und Amylalkohol ausgeschüttelt.

Tabelle: pH-Stabilität des Kupfer-Protamin-Komplexes
(Clupein-HCl III/50 mg/10 ml; 1,75 μ Cu⁺⁺)

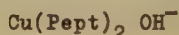
pH	freigesetzte Kupfermenge	% des Kupfergehaltes
1	1,5	85,71
2	1,2 - 1,5	68,57 - 85,71
3,2	0,9 - 1,0	51,42 - 57,14
5	0,5 - 0,7	28,57 - 40,00
7	0,01 - 0,03	0,571 - 1,71
8,1	0,6 - 0,8	34,28 - 45,71
10	1,5 - 1,6	85,71 - 91,42

Untersuchungen des Clupein-Kupfer-Komplexes als
Katalysator der Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat

Man nimmt an, dass HISTIDIN und SERIN in den aktiven Zentren der proteolytischen Fermente einen Einfluss auf die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat aufweisen. Nach den Untersuchungen von KATCHALSKY (28) lassen sich Histidinpolymer synthetisieren, deren Aktivität jedoch nur 1/1000-stel der des Chymotrypsins erreicht. Die Aktivität lässt sich weder durch Zusatz von Polyvinylalkohol noch von Polyserin steigern. W.L. KOLTUN konnte zeigen, dass basische Komplexe der Formel



oder



die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat steigern. Das p-Nitrophenylacetat hat in Anwesenheit grosser Mengen Peptide oder Eiweisse einen Acetylierungseffekt. Um diese Grössen und die Absorption von CO_2 durch p-Nitrophenol zu eliminieren, wurden Leeransätze ohne Kupfer bei 400 $\text{m}\mu$ gemessen.

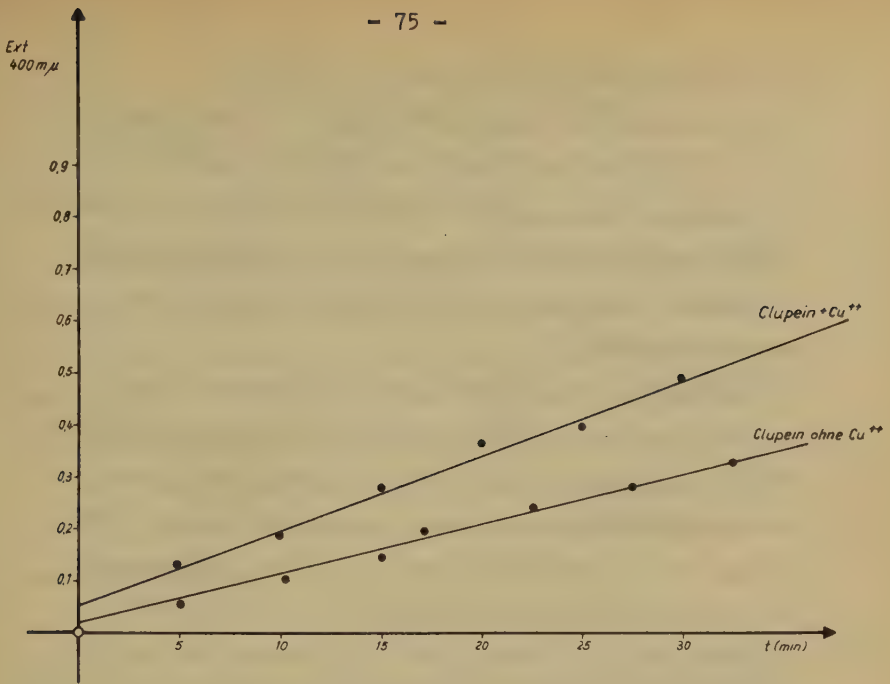


Abb. Nr. 44 : Einwirkung des Kupfer-Protamin-Komplexes
auf die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat.

Durchführung der Versuche:

2 ml 0,02m p-Nitrophenylacetat in Dioxan wurden zu 2 ml Clupeinlösung (25 mg/ml) in 0,01m Borax-Kaliumbiphosphatpuffer pH 7,2 pipettiert. Der Pufferlösung wurde soviel NaCl zugesetzt, dass bei erreichten Endvolumen von 4,5 ml eine Ionenstärke von 0,16 vorlag.

Untersuchungen über den Einfluß von Cyanid:

Gibt man Cyanid zu einer Cu^{++} -Lösung, so wird dieses zu Cu^+ reduziert, wobei eine entsprechende Menge der CN^- -Ionen zu Dicyan oxydiert wird. $(\text{CN})_2$ gibt eine eigene Reduktionsstufe bei den polarographischen Untersuchungen. Durch Aufkochen der Lösung kann das $(\text{CN})_2$ entfernt werden.

Um den Nachweis von einwertigem Cu am Protamin oder dem Nukleoprotamin zu erbringen, wurden Lösungen dieser Präparate gegen Cu-freies Puffer pH 2 dialysiert, das Dialysat im Rotationsverdampfer eingeeengt und mit einer Lösung von 1 n Ammoniumchlorid und 1 n NH_3 aufgenommen. Die polarographische Analyse ergab ein einziges Halbstufenpotential bei minus 0,25 Volt. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß kein einwertiges Cu am Protamin gebunden vorliegt.

Die Untersuchungen über die Hydrolyseaktivität des Cu-Protamin-Komplexes gegenüber p-Nitrophenylacetat hatten ergeben, daß dieser Komplex eine meßbare Freisetzung von p-Nitrophenol bewirkt. Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob einwertiges Cu gleichartige Komplexe mit gleichen Funktionen bilden kann, wurden Clupeinlösungen unter dem Einfluß von NaCN untersucht. Es wurden 10 ml Lösungen von 25 mg Clupein/ml in 0,2 molaren Tris-Puffer pH 7,5 mit 1 mg NaCN versetzt und bei 0°C gegen 400 ml Cu-freies Wasser 24 Stunden dialysiert. Die Protaminlösungen wurden zur Trockne eingeeengt und wie schon beschrieben, naß verascht.

Nach den polarographischen Untersuchungen liessen sich 5,24 Gamma einwertiges Cu bei einem Halbstufenpotential von minus 0,54 V nachweisen.

Mit Cyanid behandeltes Clupein wurde in 0,01 molarem Borax-Kaliumbiphosphat-Puffer p_H 8,2 bei einer Konzentration von 25 mg/ml in ihrem Verhalten gegenüber p-Nitrophenylacetat gemessen. Es liess sich nachweisen, dass keine Aktivitätserhöhung gegenüber den Leerwerten von Cu-freiem Clupein auftrat. Wir schliessen daraus, dass der Cu-Protamin-Komplex nur von zweiwertigem Cu gebildet wird.

Untersuchungen über die Rekombination von Nukleoprotamin unter dem Einfluss von Cu-Ionen

Als Ausgangsmaterial für die Versuche dienten uns DNS-Präparate, die wir nach der Abspaltung des Clupeins unter dem Einfluss von Harnstoff und durch anschliessende Alkoholfällung erhalten hatten (Siehe S. 45)
180 mg DNS/1 wurden in 200 ml 10 %iger Cu-freier NaCl-Lösung unter Rühren bei 4° C gelöst. Die Ansätze wurden nach 24 Stunden bei 5000 U/Min. zentrifugiert. Zu den so bereiteten klaren Lösungen wurden bei Benutzung eines Magnetrührers steigende Mengen Clupein in 10 %iger NaCl-Lösung zugegeben. Zu einzelnen Ansätzen wurden steigende Mengen Cu^{++} zugegeben.

Tabelle: Rekombination von Nukleoprotamin unter dem Einfluss von Cu-Ionen

Nr. des Versuches	mg DNS/l	mg Clupein-HCl (III)	μCu ⁺⁺	Ausbeute in mg	N-Gehalt n. Kjeldahl	P-Gehalt n. Allen	μCu-Gehalt
1	180	40	-	80	19,35 %	5,64	- / 100 mg
2	180	80	-	93	19,21 %	5,59	-
3	180	120	-	94	19,20 %	5,59	•
4	180	180	•	105	19,47 %	5,67	-
5	180	40	20	87	19,01 %	5,04	5,7
6	180	80	40	92	19,31 %	5,63	28,8
7	180	120	60	98	19,34 %	5,64	37,8
8	180	180	90	107	19,34 %	5,64	77,2

Die angeführte Tabelle lässt erkennen, dass der Cu-Zusatz keinen Einfluss auf die Rekombination zu Nukleoprotamin hat, wenn man von den etwas erhöhten Stickstoffwerten absieht. Es war denkbar, dass die zugesetzte Cu-Menge zum Protamin für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht, also an das Protamin eventuell intermolekular gebunden war. Aus diesem Grunde setzten wir bei der Wiederholung dieser Versuche das Cu der DNS-Lösung zu. Das bei Eingiessen in destilliertes Wasser ausfallende Nukleoprotamin unterschied sich nicht von dem, das bei der Rekombination mit Cu-haltigem Protamin gewonnen werden konnte. Es darf der Schluß gezogen werden, daß das Cu im biologischen System der Zelle nicht die Bindung des Protamins an die DNS beeinflusst.

Nachweis des Cu-Protamin-Komplexes nach papier-
elektrophoretischer Trennung.

Zum Nachweis des an Protamin gebundenen Kupfers wurden Proben von Clupein-HCL III in einer Hochspannungselektrophoreseapparatur nach WIELAND und PFLEIDERER untersucht. Wir erwarteten von dieser Methode eine Aussage darüber, ob das Kupfer unter der Einwirkung des elektrischen Feldes vom Protamin abgetrennt werden kann und wie sich der Komplex bei pH-Verschiebungen verhält.

Zur Durchführung unserer Versuche benutzten wir das Papier 2214 MN, das sich als kupferfrei in unserem Sinne erwies. Als Puffer benutzten wir einen Pyridin-Eisessig-Puffer von pH 6,5. Wir arbeiteten bei einer Spannung von 3000 Volt bei einer Papierlänge von 32 cm. Die Stromstärke betrug im Mittel 16 - 20 mA. Nach 30 Minuten wurden die Trennungen unterbrochen und die Pherogramme getrocknet. Zum Nachweis des gebundenen Kupfers wurden die Pherogramme 5 Minuten in eine Lösung von Alizarinblau S eingelegt, und 5 Minuten mit Essigsäure ausgewaschen.

Alizarinblau S-Lösung: 200 mg Alizarinblau S werden in 100 ml konzentrierter Essigsäure gelöst, das Gemisch bis auf 55° C erwärmt, auf Zimmertemperatur abgekühlt und filtriert. Zur Benutzung wird die Stammlösung mit 70 %iger Essigsäure auf das Zehnfache verdünnt.

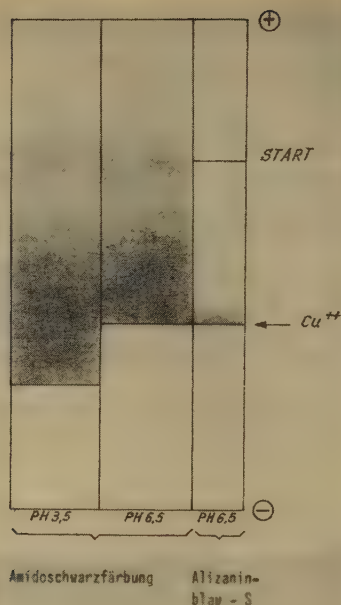


Abb. Nr. 45 : Nachweis des gebundenen Kupfers mit Alizarinblau - S nach papierelektrophoretischer Trennung.

Es lässt sich mit der angegebenen Methode das gebundene Kupfer nachweisen, da die Nachweisgrenze ausgesprochen niedrig liegt. Die Autoren der Methode geben als unterste Grenze eine Konzentration von 0,0025 μ an. Die Versuche im sauren pH-Bereich zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Es ist schon seit langem bekannt, dass die Kupferkomplexe bei pH 3,5 instabil sind. Wir erwarteten nun, dass sich das Kupfer bei diesem pH von der Protaminbande abtrennen liess, Leider war das nicht der Fall, da das Clupein sich über die ganze Wanderungsstrecke verteilt und keine sauberen Banden lieferte.

L i t e r a t u r

1. A. Kossel, Protamine und Histone Leipzig 1929
2. K. Felix, H. Fischer, A. Krekels und R. Mohr Z.physiol.Chem. 287,224 (1951)
3. K. Felix und A. Krekels Z.physiol.Chem. 293,284 (1953)
4. A.E. Mirsky und A.W. Pollister Proc.nat.Acad. Sci.U.S.A., 28,344 (1942)
5. K. Felix, 2. Colloq.d.Deutschen Ges. f.physiol.Chem.am 6./7.April 1951 i.Mosbach-Baden S. 68
6. K. Felix, A. Goppold-Krekels und H. Lehmann Z.physiol.Chem., 312,57 (1958)
7. K. Felix American Scient., 43/3,431 (1955)
8. K. Felix und A. Mager Z.physiol.Chem., 249,111 (1937)
9. E. Waldschmidt-Leitz u. E. Günther Makromol.Chem., 2,120 (1948)
10. K. Felix, H. Fischer, A. Krekels und H.M. Rauen Z.physiol.Chem., 286,67 (1950)
11. St. Moore u. W.H.Stein J. Biol.Chem., 186,367 (1948)
12. A. Tabrizi, unveröffentlichte Dissertation, 1961

13. M. Feuhelman, R. Langridge, W.E. Seeds Nature,
 A.R. Stokes, H.R. Wilson, C.W. Hooper, 175,834 (1955)
 H.F. Wilkins, R.K. Barclay, L.D. Hamilton

14. M.H.F. Wilkins, A.R. Stokes u. Nature,
 H.R. Wilson 171,737 (1953)

15. R.E. Franklin und R.G. Gosling Nature,
 171,737 (1953)

16. M.H.F. Wilkins und J.R. Randall Biochim.Biophys.
 Acta,
 10,192, (1953)

17. K. Felix, The Chemical Structure of (1953)
 Proteins

18. R. Monier und M. Justisz Biochim.Biophys.
 Acta,
 15,62 (1954)

19. E. u. E. Stedman, Cold Spring Harbor 12,224 (1947)
 Sympos. Quantitativie
 Biol.

20. A.E. Mirsky und H. Ris J. Gen. Phys.,
 31,1 (1947)

21. H. Steudel Z.physiol.Chem.,
 73,471 (1911)

22. W.W. Wainio, C. V. Wende u. N.F.Shimp J. Biol.Chem.,
 234,2433 (1959)

23. H. Markowitz, G.E. Cartwright und J. Biol.Chem.,
 M.M. Wintrobe 234,40 (1959)

- | | |
|---|--|
| 24. J. Uriel, H. Götz und P. Grabar | Schweiz.med.
Wochenschr.,
87,431 (1957) |
| 25. C.J. Gubler, M.E. Lahey, H.Ashenbrucker, J.Biol.Chem.,
G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe und
G. Gran | 196,209 (1952)
Anal.Chim.Acta,
14,150 (1956) |
| 26. M.S. Narsinga Rao u. Hira Lal | J.Am.Chem.Soc.,
80,3226 (1958) |
| 27. C.F. Crampton, R. Lipshitz,
R. u. E. Chargaff | J.Biol.Chem.,
125 |
| 28. E. Katchalski, G.D. Fasman, E. Simons
E.R.Blout, F.R.N. Gurd u. W.L.Koltun | Arch.Biochem.
Biophys.,
88,361 (1960) |
| 29. W.L. Koltun, M. Fried u. F.R.N. Gurd | J.Am.Chem.Soc.
82,233 (1960) |
| 30. F. Bonhoeffer u. H.K. Schachman | Biochem.Biophys.
Research Commun.
2,366 (1960) |
| 31. A.F. Harris und A. Saifer | J. Neurochem.,
5,383 (1960) |
| 32. I.S. Edelman, TS'O,P.O.P. u. J. Vinograd | Biochem.Biophys.
Acta,
43,393 (1960) |
| 33. Hira Lal | J.Am.Chem.Soc.
81,844 (1959) |
| 34. M. Laskowski u. H. A. Scheraga | J.Am.Chem.Soc.,
76,6305 (1954) |

- | | |
|---|--|
| 35. I.M. Klotz u. R.E. Heiney | J.Am.Chem.Soc.,
81,3802 (1959) |
| 36. R.L. Gustafson u. A.E. Martell | J.Am.Chem.Soc.,
81,525 (1959) |
| 37. R.B. Martin u. J.R. Edsall | J.Am.Chem.Soc.,
82,1107 (1960) |
| 38. R.B. Martin, M.Chaberlin u.J.R.Edsall | J.Am.Chem.Soc.,
82,495 (1960) |
| 39. J.R. Cann u. R.A.Phelps | J.Am.Chem.Soc.,
81,4378 (1959) |
| 40. I.M. Klotz und S.W. Luborsky | J.Am.Chem.Soc.,
81,5119 (1959) |
| 41. M. Hallaway | Biochem.Biophys.
Acta,
36,538 (1959) |
| 42. B.R. Rabin | Biochem.Soc.Symp.,
15,21 (1958) |
| 43. W.L. Koltun u. F.R.N. Gurd | J.Am.Chem.Soc.,
81,301 (1959) |
| 44. T. Ando u. F. Sawada | J. Biochem.,
49,252 (1961) |
| 45. D.E. Zimmermann | Dissertation 1959
Johann-Wolfgang Goethe-
Universität, Frankfurt/M |
| 46. G. Bjerrum | |

Dem allzu früh verstorbenen Herrn Prof. Dr.med. Kurt FELIX danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine stets hilfsbereite Unterstützung.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. med. Erich HEINZ für das Verständnis, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Dr. Eberhard ZIMMERMANN bin ich für seine Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Über das Vorkommen von zweiwertigem Kupfer im Nucleoprotamin der Heringsspermatozoenkerne und über die intermolekulare Komplexbildung des Protamins

im Institut für Physiologische Chemie der Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. med. Kurt Felix und Prof. Dr. med. E. Heinz mit Unterstützung durch Dr. phil. nat. Eberhard Zimmermann, Würzburg, Physiologisch chemisches Institut der Universität Würzburg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiologische Chemie veröffentlicht.

Offenbach/Main, den 20.11.1963

Hanns-Pek Nast.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

- Auszug -

1. Prof. Dr. med. Kurt Felix
2. Prof. Dr. med. Erich Heinz
3. Prof. Dr. med. Ferdinand Hoff
4. Prof. Dr. med. Peter Holtz
5. Prof. Dr. med. Karl Wezler
6. Prof. Dr. med. Ernst Wollheim

Lebenslauf

Ich wurde am 7. April 1936 in Berlin als Sohn des Dr. Franz Nast geboren. Die Reifeprüfung bestand ich im März 1957. In Frankfurt (Main) studierte ich acht Semester, in Wien ein Semester und in Würzburg drei Semester Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1960 in Frankfurt ab. Im Juli 1963 bestand ich die ärztliche Prüfung in Würzburg. Seit dem 15. August 1963 bin ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg angestellt.

Hanns-Pek Nast.

Frankfurt (Main), den 20. Oktober 1963

